



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
Τμήμα ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της κινητικής των Σταθμινών 1, 2 και 3 στην Πειραματική
Αυτοάνοση Εγκεφαλομυελίτιδα

ΤΟΥΛΟΥΜΗ ΟΛΓΑ

Τεχνολόγος Ιατρικών Εργαστηρίων

Τριμελής εξεταστική επιτροπή:

- Χατζηγεωργίου Γεώργιος, Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Επιβλέπων .
- Γερμενής Αναστάσιος, Καθηγητής Εργαστηριακής Ανοσολογίας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Γρηγοριαδης Νικόλαος , Καθηγητής Νευρολογίας του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης

Διπλωματική Εργασία υποβληθείσα στο Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ως
μέρους των απαιτήσεων για την απόκτηση Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης
« ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ»

Λάρισα, Οκτώβριος, 2015



UNIVERSITY OF THESSALY
SCHOOL OF HEALTH SCIENCE
FACULTY OF MEDICINE



MASTER PROGRAM IN
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

MASTER THESIS
Kinetic study of Stathmins 1, 2 and 3 in Experimental Autoimmune
Encephalomyelitis

By
TOULOUMI OLGA
Technologist of Medical Laboratories

A three-member committee of inquiry

- Hadjigeorgiou Georgios Prof. of Neurology, Medical School, University of Thessaly, Supervisor.
- Germenis Anastasios Prof. of Laboratory Immunology , Medical School ,University of Thessaly
- Grigoriadis Nikolaos Prof. of Neurology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki.

Master Thesis submitted to the Faculty of Medicine of the University of Thessaly in partial
fulfillment of the requirements for the degree of Master in
“CLINICAL APPLICATIONS OF MOLECULAR MEDICINE”

Larisa, October, 2015

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ –ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	5-6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ ,ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ.....	7
ABSTRACT , KEY WORDS.....	8
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	9
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	9
1.1ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ.....	9
1.1.2. ΑΚΤΙΝΗ –ΜΙΚΡΟΙΝΙΔΙΑ.....	10
1.1.3 ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ ΙΝΙΔΙΑ.....	10-11
1.1.4 ΜΙΚΡΟΣΩΛΙΝΙΣΚΟΙ.....	11-13
1.1.5. Πρωτεΐνες που αλληλοεπιδρούν με τους μικροσωλινίσκους.....	13
1.1.5.1 Συνδεδεμένη με τους μικροσωλινίσκους–πρωτεΐνη (MAP).....	13
1.1.5.2 Πρωτεΐνες εντοπισμού (+) άκρου.....	13-14
1.1.5.3 Κινητικές Πρωτεΐνες.....	14
1.1.6.Πρωτεΐνες που προκαλούν αποσταθεροποίηση των μικροσωλινίσκων.....	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	15
2.1 Σταθμίνη 1.....	15-16
2.2 Σταθμίνη 2-SCG10 (Superior Cervical Ganglion 10).....	16-17
2.3 Σταθμίνη 3-SCLIP (SCG10-like protein).....	17
2.3 Σταθμίνη 4- RB3 και οι ισόμορφές RB3' και RB3''.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	18
Πολλαπλή Σκλήρυνση ή Σκλήρυνση Κατά Πλάκας (Σ.Κ.Π).....	18
3.1 Εισαγωγή –Επιδημιολογία.....	18-19
3.2Αιτιολογία.....	19
3.3.Παθοφυσιολογία της Σ.Κ.Π.....	19-20
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	21
Πειραματική Αυτόανοση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ).....	21
4.1.Πειραματικά μοντέλα της ΠΑΕ.....	21
4.2 Κλινική ανάλυση της ΠΑΕ.....	22-23
Σκοπός της παρούσας μελέτης.....	24
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	25

Υλικά και Μέθοδοι.....	25
5.1 Πειραματόζωα.....	25
5.2 Επαγωγή χρόνιας ΠΑΕ.....	25-26
5.3 Κλινική εξέταση πειραματόζωων.....	26
5.4 Θυσία πειραματόζωων και συλλογή ιστών.....	26-27
5.5 Μοριακή ανάλυση της έκφρασης των Σταθμινών.....	27
5.5.1 Απομόνωση ολικού RNA.....	27-28
5.5.2 Σύνθεση cDNA.....	28
5.5.3 PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR).....	28-29
5.6 Τεχνικές Ιστοχημείας και Ανοσοιστοχημείας.....	29
5.6.1 Ιστοχημικές χρώσεις.....	29
5.6.1.1 Αιματοξυλίνης-Εωσίνης.....	29-30
5.6.1.2 Luxol Fast Blue.....	30
5.6.2 Ανοσοιστοχημικές χρώσεις.....	30
5.6.2.1 Ανοσοιστοχημεία οπτικού μικροσκοπίου.....	30-31
5.6.2.2 Διπλή ανοσοϊστοχημεία φθορισμού.....	32-33
5.7 Ιστοπαθολογική Εκτίμηση.....	33-34
5.8 Στατιστική ανάλυση.....	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6.....	35
Αποτελέσματα.....	35
6.1 Κλινικά εκτίμηση της ΠΑΕ.....	35-36
6.2 mRNA έκφραση των Σταθμινών.....	36
6.3 Πρωτεϊνική έκφραση των Σταθμινών στο νωτιαίο μυελό.....	37-39
6.4 Μελέτη της έκφρασης των ολιγοδενροκυττάρων στις χρονικές στιγμές της ΠΑΕ και η συνέκφραση τους με την Σταθμίνη 1 στη λευκή ουσία.....	40-42
6.5 Μελέτης της έκφρασης των αστροκυττάρων στις χρονικές στιγμές της ΠΑΕ και η συνέκφραση τους με την Σταθμίνη 1 στη λευκή ουσία.....	42-43
6.6 Μελέτη των νευρώνων στις χρονικές στιγμές της ΠΑΕ και η συνέκφραση με τη Σταθμίνη 2 και Σταθμίνη 3.....	44-46
6.7 Αξονική μελέτη στις χρονικές στιγμές της ΠΑΕ και η συνέκφραση με τη Σταθμίνη 2 και Σταθμίνη 3.....	46-50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7.....	51
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51-56
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	57-63

ΠΡΟΛΟΓΟΣ –ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ο φυσιολογικός ρόλος των Σταθμινών είναι η ρύθμιση της ισορροπίας της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων και η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Πρόκειται για πρωτεΐνες που συνεχώς εναλλάσσονται μεταξύ της συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης του κυτταροσκελετού με πρωταρχικό σκοπό τον ορθό σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου.

Στη μελέτη αυτή αναλύθηκε το πρότυπο έκφρασης των Σταθμινών και η συσχέτιση τους σε διαφορετικά χρονικά σημεία στο μοντέλο της ΠΑΕ. Ταυτοποιήθηκε η έκφραση τους σε ολόκληρο το νωτιαίο μυελό και έγινε υπο-ανάλυση τους στη φαιά και λευκή ουσία. Διερευνήσαμε επίσης την συσχέτιση τους με τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος καθώς και με πρωτεΐνες που εκφράζονται σε τραυματισμένους άξονες ή σε άξονες που βρίσκονται σε κατάσταση αναγέννησης.

Η παρούσα εργασία στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ» του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας ,Σχολή Επιστημών Υγείας , Τμήμα Ιατρικής και είναι αποτέλεσμα συνεργασίας με το Εργαστήριο Πειραματικής Νευρολογίας και Νευροανοσολογίας της Β΄ Νευρολογικής Κλινικής του Α.Π.Θ. όπου και πραγματοποιήθηκε το πειραματικό μέρος της εργασίας .

Στα πλαίσια της προσπάθειας αυτής θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον Καθηγητή Νευρολογίας κ. Χατζηγεωργίου Γεώργιο που μου εμπιστεύτηκε την ανάθεση της εργασίας καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές του. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Ανοσολογίας κ.Γερμενή Αναστάσιο για τις εποικοδομητικές του παρατηρήσεις του. Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Νευρολογίας του Α.Π.Θ. κ Γρηγοριάδη Νικόλαο για τη συμβολή του στο πειραματικό μέρος. Ακόμη για την πολύτιμη επιστημονική στήριξη του στο τομέα της Νευροπαθολογίας στη επεξεργασία των αποτελεσμάτων και στη συγγραφή της εργασίας. Επιπροσθέτως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κ. Καρακώστα Δημήτριο, Διευθυντή της Β΄Νευρολογικής Κλινικής του Α.Π.Θ.,για το αμέριστο ενδιαφέρον του για τις ερευνητικές δραστηριότητες όλων των μεταπτυχιακών φοιτητών του εργαστηρίου. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ.Ειρηνοπούλου Θεανώ και την καθηγήτρια κ.Carmen Diaz για την εκπαίδευση που μου παρείχαν σε ότι αφορά το συνεστιακό μικροσκόπιο και τον καθηγητη κ.Andre Sobel για την ευγενική χορηγία των αντισωμάτων των Σταθμινών.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Βιολόγο PhD–ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Πειραματικής Νευροανοσολογίας κ.Λαγουδάκη Ροζα για την αμέριστη προσφορά της στην παροχή πολύτιμων γνώσεων και συμβουλών σχετικά με την παρούσα εργασία αλλά και για την ηθική υποστήριξη

της. Την Τεχνολόγο Ιατρικών Εργαστηρίων κ. Νουσιοπούλου Ευγγελία και τον Βιοχημικό κ.Θεοτόκη Πασχάλη για την τεχνική υποστήριξη και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου τη Βιολόγο κ.Κεσίδου Ευαγγελία και την Μοριακή Βιολόγο κ.Πουλατσίδου Κυριακή. Για τη συνεργασία τους. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την ηθική υποστήριξη τους καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης και συγγραφής της εργασίας .

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Ο φυσιολογικός ρόλος των Σταθμινών είναι η ρύθμιση της ισορροπίας της λειτουργίας των μικροσωληνίσκων και η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Πρόκειται για πρωτεΐνες που συνεχώς εναλλάσσονται μεταξύ της συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης του κυτταροσκελετού με πρωταρχικό σκοπό τον ορθό σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου.

Σκοπός: Μελετήσαμε την παρουσία των Σταθμινών στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ) με πιο ενδελεχή μελέτη στο νωτιαίο μυελό παρουσία φλεγμονής, στο μοντέλο πειραματικής αυτόανοσης εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ), προκειμένου να εκτιμηθεί ο ρόλος τους.

Υλικά και Μέθοδοι: Μύες C57Bl/6 συγκρίθηκαν στο μοντέλο ΕΑΕ σε τρία στάδια της νόσου (10 ημερών, οξείας και χρόνιας) σε συσχέτιση με τα φυσιολογικά. Η έκφραση του mRNA μελετήθηκε χρησιμοποιώντας Real Time-PCR μέθοδο και η έκφραση της πρωτεΐνης των τριών Σταθμινών μελετήθηκε με τη χρήση ανοσοφθορισμού κάτω από οπτικό μικροσκόπιο και συνεστίασης.

Αποτελέσματα: Υπήρχε μειωμένη έκφραση mRNA της Σταθμίνης 1 στην οξεία φάση της ΠΑΕ στο νωτιαίο μυελό και της Σταθμίνης 3, μείωση παρούσα τόσο στην οξεία όσο και στη χρόνια φάση. Υπό μικροσκοπία παρατηρήθηκαν μείωση της Σταθμίνης 1 και 2 στην οξεία φάση. Ωστόσο, οι μετρήσεις στην λευκή ουσία, όπου η φλεγμονή ήταν παρούσα, έδειξαν αυξημένη έκφραση όλων των Σταθμινών. Η παρουσία της Σταθμίνης 1 στην οξεία φάση στη λευκή ουσία γενικά συνεκφράζεται με φυσικό NG2⁺ και O4⁺ κύτταρα, αλλά σε χαμηλότερα επίπεδα με τα κύτταρα που εξέφραζαν CNPase⁺. Η Σταθμίνη 2 και 3 εκφράστηκαν μόνο στην ομάδα της οξείας και χρόνιας φάσης στους άξονες. Επίσης έδειξαν αυξημένη συνέκφραση με τη μη- φωσφορυλιωμένη μορφή νευρονηματίου (SMI 32) στη φαιά ουσία. Επιπλέον, στο εσωτερικό της φλεγμονής στην οξεία ομάδα η Σταθμίνη 2 έδειξε να συνεκφράζεται με την Πρωτεΐνη Προδρόμου Αμυλοειδούς (APP), δείκτης της αξονικής βλάβης, ενώ η Σταθμίνη 3 ακολούθησε την αντίστροφη πορεία και συν εκφράζεται με την αυξητική πρωτεΐνη -GAP 43, δείκτη για την αναγέννηση των νευραξόνων. Συμπεράσματα: Η φλεγμονώδης απομυελίνωση στο ΚΝΣ σηματοδοτεί μεταβολές στην έκφραση των Σταθμινών με επιπτώσεις στην αναδιοργάνωση της εκφυλισμένης περιοχής, οι οποίες χρίζουν περεταίρω διερεύνησης.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

Σταθμίνη 1, Σταθμίνη 2, Σταθμίνη 3, Πειραματικής Αυτόανοσης Εγκεφαλομυελίτιδας (ΠΑΕ)

ABSTRACT

Introduction: The physiological role of stathmins is the regulation of microtubule equilibrium and cytoskeleton reorganization. They are proteins that constantly alternate between assembly and disassembly of the cell with the primary purpose of the correct formation of the mitotic spindle.

Purpose: We studied the presence of Stathmins in spinal cord in the model of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in order to estimate their role.

Material and Methods: Mice were compared in the EAE model in three stages of the disease (10 days, acute and chronic) in correlation with control. The mRNA expression was studied using Real Time-PCR method and protein expression of stathmin-1, SCG10 and SCLIP were studied using immunofluorescence under optical and confocal microscopy.

Results: There was reduced mRNA expression in acute phase of stathmin 1 in the spinal cord and SCLIP, reduction present both in acute and in chronic phase. Under microscopy were observed a decrease of stathmin 1 and SCG10 in acute phase. However measurements in the white matter where inflammation was present, revealed increased expression of all stathmins. The presence of stathmin 1 at the acute phase in white matter generally was co expressed with NG 2+ and O4+ cells but in lower levels with CNPase + cells. SCG10 and SCLIP were expressed only in axons in the acute and chronic phases. They showed increased co expression with non-phosphorylated neurofilament (SMI 32) in the grey matter. Additionally, inside the inflammation in acute group SCG10 was co expressed with APP, marker of axonal damage whereas SCLIP followed the opposite course and was coexpressed with GAP 43, marker for axonal regeneration.

Conclusions: Inflammatory demyelination alters stathmin expression in inflammatory areas. Whether these changes may have any impact on the accurate reorganization of the degenerate region remains to be further investigated.

KEY WORDS

Stathmin-1, SCG10, SCLIP, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

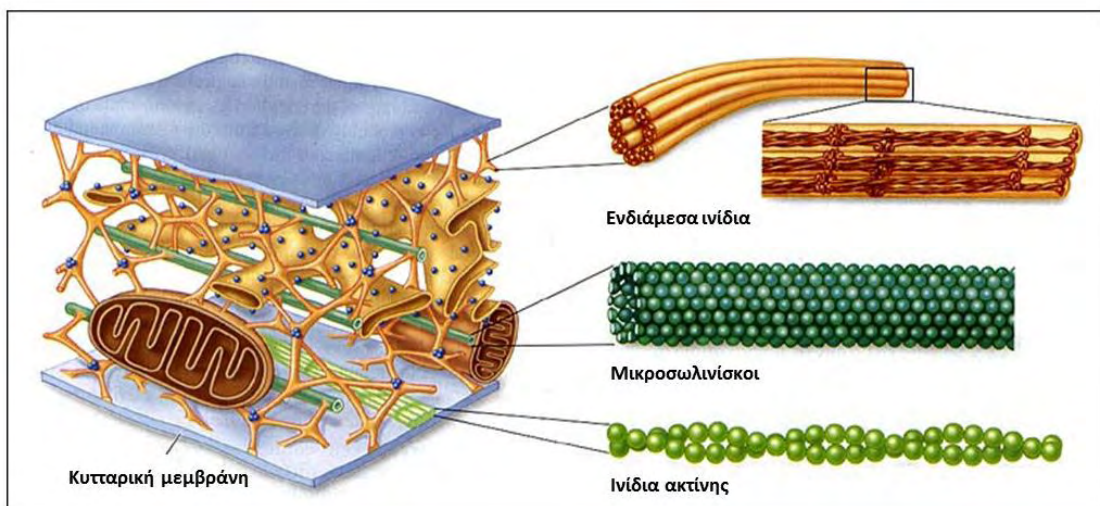
ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΚΥΤΤΑΡΟΣΚΕΛΕΤΟΥ

Το ευκαρυωτικό κύτταρο είναι το κύτταρο που περιλαμβάνει πυρήνα, οργανίδια τα οποία βρίσκονται οργανωμένα μέσα στη κυτταρική μεμβράνη και τον κυτταροσκελετό. Η δυνατότητα του ευκαρυωτικού κυττάρου να αλλάζει σχήμα βασίζεται αποκλειστικά στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. (Εικόνα 1)

Ο κυτταροσκελετός περιλαμβάνει ένα δίκτυο πρωτεϊνικών ινιδίων τα οποία είναι απαραίτητα ώστε να εκτελούνται σημαντικές λειτουργίες του κυττάρου. Παρέχει τα δομικά όρια του κυττάρου προσδίδοντας το σχήμα του, είναι υπεύθυνος για την κίνηση ολοκλήρου του κυττάρου καθώς επίσης αποτελεί και εσωτερικό δίκτυο μεταφοράς ουσιών. Εκτός από τη συνεχή αναδιοργάνωση του κυττάρου κατέχει σημαντικό ρόλο στη διαίρεση του κυττάρου. Η δομή και η λειτουργία του κυτταροσκελετού μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τον οργανισμό.

Αποτελείται από τρία είδη πρωτεϊνών οι οποίες διαφέρουν στο μέγεθος και στη σύνθεση τους
α) ακτίνη-μικροινίδια, β) ενδιάμεσα ινίδια και γ) τους μικροσωληνίσκους [1.2.3]



Εικόνα 1: Η οργάνωση του κυτταροσκελετού, η εικόνα είναι προσαρμοσμένη ανατύπωση: Johnson, George B. The Living World. © 2006 The McGraw-Hill Companies, Inc.

1.1.2. ΑΚΤΙΝΗ -ΜΙΚΡΟΙΝΙΔΙΑ

Η ακτίνη είναι μια πρωτεΐνη η οποία ανευρίσκεται στα ευκαρυωτικά κύτταρα, με μοριακό βάρος 42-kDa, σχηματίζει τα μικροϊνίδια το μέγεθος των οποίων είναι 6 νανομετρα (nm). Βρίσκεται μέσα στον κυτταροσκελετό με τη μορφή ελεύθερου σφαιροειδούς μονομερούς που ονομάζεται G-ακτίνη ή μπορεί να ανευρεθεί με τη μορφή γραμμικού πολυμερούς που ονομάζεται F-ακτίνη.

Συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες του κυττάρου όπως την κίνηση, το σχήμα και στη ρύθμιση της μεταγραφής του κυττάρου. Επιπλέον η αλληλεπίδραση της γραμμικής ακτίνης με την μυοσίνη συμβάλλει στη σύσπαση των μυών. Υπάρχει σε τρεις ισόμορφες α , β και γ ακτίνη οι οποίες διαφέρουν σε μερικά μόνο αμινοξέα, διαφορές που αφορούν την αμινοτελική ομάδα και χωρίζονται με βάση το ισοηλεκτρικό φορτίο τους. Ανευρίσκεται κυρίως στους μυς και περιλαμβάνει την α -σκελετική, α -καρδιακή, α -αορτική και γ 2-εντερική, όπου η β - και γ 1 ισόμορφες ανευρίσκονται εκτός των μυϊκών κυττάρων.[4]

1.1.3 ΕΝΔΙΑΜΕΣΑ ΙΝΙΔΙΑ

Τα ενδιάμεσα ινίδια αποτελούν και αυτά πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού με διάμετρο 10 nm και ονομάζονται έτσι γιατί βρίσκονται σε μέγεθος ενδιάμεσα από αυτό των μικροϊνιδίων και των μικροσωλινίσκων. Δεν αποτελούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν ενεργά στην κίνηση του κυττάρου αλλά παρέχουν και συμβάλουν στη δομική κατασκευή και το σχήμα του κυττάρου.

Σε αντίθεση με τις άλλες πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού τα ενδιάμεσα ινίδια αποτελούνται από μια πληθώρα διαφορετικών πρωτεϊνών που εκφράζονται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων.

Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση την αλληλουχία των αμινοξέων τους σε έξι τύπους. Τον τύπο I και II στους οποίους ανήκουν οι κερατίνες και εκφράζονται στα επιθηλιακά κύτταρα, τον τύπο III που περιλαμβάνει α) την βιμεντίνη η οποία εκφράζεται στους ινοβλάστες, στα λευκοκύτταρα του αίματος, β) την δεσμίνη που εκφράζεται στα μυϊκά κύτταρα, γ) την γλοιακή ινιδική όξινη πρωτεΐνη (GFAP-Glial fibrillary acidic protein) η οποία εκφράζεται σε κύτταρα της γλοίας και δ) την περιφερίνη η οποία ανευρίσκεται στα περιφερικά νεύρα.

Επίσης υπάρχει ο τύπος IV στον οποίο ανήκουν α) οι νευροϊνιδιακές πρωτεΐνες (NF) και χωρίζονται σε ελαφριές, μεσαίες και βαριές (NF-L, NF-M και NF-H) ανευρίσκονται στο σώμα και στους άξονες των νευρώνων β) η α -ιντερνεξίνη η οποία εκφράζεται στους νευρώνες. Ο τύπος V στον οποίο ανήκουν οι λαμίνες οι οποίες βρίσκονται στον πυρήνα όλων των κυττάρων

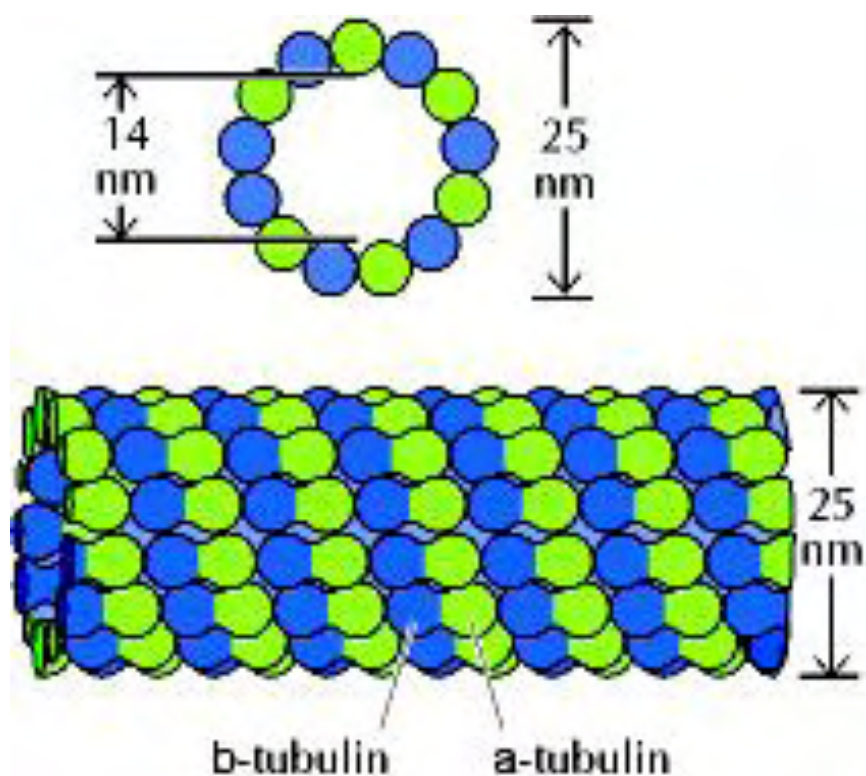
και τέλος ο τύπος VI στον οποίο ανήκει η Νεστίνη, η οποία εκφράζεται στα προγονικά κύτταρα του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (ΚΝΣ).

1.1.4 ΜΙΚΡΟΣΩΛΙΝΙΣΚΟΙ

Οι μικροσωλινίσκοι αποτελούν την τρίτη και μεγαλύτερη σε μέγεθος δομική πρωτεΐνη του κυτταροσκελετού με διάμετρο στα 25nm και βρίσκονται σε συνεχή συναρμολόγηση και αποσυναρμολόγηση μέσα στο κύτταρο ανάλογα με τις ανάγκες του. Ο ρόλος τους είναι σημαντικός για την λειτουργία του κυττάρου αφού διαμορφώνουν το σχήμα του, προσφέρουν μηχανική στήριξη, την ενδοκυττάρια μεταφορά οργανιδίων και στο διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μίτωσης.

Ο σχηματισμός των μικροσωλινίσκων γίνεται από τον πολυμερισμό δύο διμερών πρωτεϊνών της α- και β- τουμπουλίνης. Οι μικροσωλινίσκοι έχουν διαφορετική πολικότητα η οποία είναι σημαντική γιατί προσδίδει την κατεύθυνση της κίνησης των μικροσωλινίσκων. Ο πολυμερισμός συμβαίνει στα άκρα όταν το διμερές της β-τουμπουλίνης έρχεται σε επαφή με το επόμενο διμερές της α- τουμπουλίνης.

Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να σχηματίζονται τα πρώτο-ινίδια τα οποία στο ένα άκρο θα έχουν εκτεθειμένη την α- τουμπουλίνη και στο άλλο την β-τουμπουλίνη, τα άκρα αυτά ονομάζονται ως αρνητικά (-) και θετικά (+) έτσι το ένα άκρο του μικροσωλινίσκου έχει το (+) μόνο με β-τουμπουλίνη και το άλλο μόνο το (-) με α- τουμπουλίνη. Η επιμήκυνση του μικροσωλινίσκου μπορεί να γίνει και από τα δύο άκρα όμως αυτή είναι πιο γρήγορη όταν πραγματοποιείται από το άκρο (+). Οι μικροσωλινίσκοι περιέχουν 13 γραμμικά πρωτοινίδια τα οποία συγκεντρώνονται γύρω από ένα κενό πυρήνα. (Εικόνα 2)



Εικόνα 2: Δομή των μικροσωλινίσκων. Διμερή α και β τουμπουλίνης πολυμερίζονται για να σχηματίσουν τους μικροσωλινίσκους τα οποία συντίθενται από 13 πρωτοινίδια σχηματίζοντας γύρω από κενό πυρήνα, η εικόνα είναι ανατύπωση από: Cover of The Cell .The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition.Cooper GM.Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

Επίσης υπάρχει και η γ -τουμπουλίνη η οποία εντοπίζεται στο κεντρόσωμα και σχετίζεται με άλλες πρωτεΐνες σχηματίζοντας μια συγκεκριμένη δομή που ονομάζεται «σύμπλεγμα δαχτυλιδιού γ -τουμπουλίνης». Αυτό το σύμπλεγμα αποτελεί τη βάση για την α -και β - τουμπουλίνη ώστε τα διμερή της να αρχίσουν να πολυμερίζονται και να λάβει χώρα ο σχηματισμός του μικροσωλινίσκου από το άκρο (-) προς το άκρο (+).

Ο ρυθμός με τον οποίο τα μονομερή ενώνονται ή όχι για να σχηματίσουν τα διμερή της τουμπουλίνης εξαρτάται από την συγκέντρωση των διμερών, αν η συγκέντρωσή τους είναι μεγαλύτερη οι μικροσωλινίσκοι θα επιμηκυνθούν ενώ αν είναι μικρότερη το μήκος τους θα συρρικνωθεί. Το (+) άκρο απεικονίζει αυτό που ονομάζεται δυναμική αστάθεια, διαδικασία που περιλαμβάνει την μετάβαση από τον αργό πολυμερισμό στο γρήγορο αποπολυμερισμό.

Η μετάβαση μεταξύ πολυμερισμού και όχι ανάπτυξης του μικροσωλινίσκου ονομάζεται «καταστροφή» και η μετάβαση μεταξύ αποπολυμερισμού και ανάπτυξης του μικροσωλινίσκου

ονομάζεται «διάσωση». Το δίκτυο των μικροσωλινίσκων ρυθμίζεται από ένα πλήθος ερεθισμάτων όπως ρυθμιστικές διαλυτές ουσίες και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις .[5,6]

1.1.5. Πρωτεΐνες που αλληλοεπιδρούν με τους μικροσωλινίσκους.

1.1.5.1 Συνδεδεμένη με τους μικροσωλινίσκους–πρωτεΐνη (MAP)

Η ρύθμιση και η λειτουργία των μικροσωλινίσκων επηρεάζεται από ένα πλήθος άλλων πρωτεϊνών εκτός της τουμπουλίνης, οι οποίες σταθεροποιούν ή όχι τη δυναμική τους. Μια από τις πρωτεΐνες αυτές είναι η Συνδεδεμένη με τους μικροσωλινίσκους–πρωτεΐνη (Microtubule-associated protein, MAP) η οποία ανευρίσκεται σε πολλούς τύπους κυττάρων και μπορεί να προκαλέσει σταθεροποίηση όσο και αποσταθεροποίηση των μικροσωλινίσκων. Συνδέεται άμεσα με την τουμπουλίνη μέσω της καρβοξυλικής της ομάδας (C-τελικό) και η σύνδεση αυτή ρυθμίζεται μέσω της φωσφορύλωσης, η οποία ενεργοποιείται μέσω μίας κινάσης της MARK (microtubule-affinity-regulating-kinase) προκαλώντας αποκολληση από τους μικροσωλινίσκους.

Η MAP πρωτεΐνη περιλαμβάνει μεγάλες πρωτεΐνες όπως MAP-1A, MAP-1B, MAP-1C (200-1000 kDa) και MAP-2 καθώς και πρωτεΐνες με μικρότερο μοριακό βάρος όπως η ΤΑΦ πρωτεΐνη (tau-protein) και η MAP-2C (55-62 kDa). Η MAP -2 στους νευρίτες και στο σώμα των νευρώνων ενώ η ΤΑΦ πρωτεΐνη στους άξονες , η MAP-1 βρίσκεται σε δενδρίτες και άξονες ενώ η MAP-4 μπορεί να βρεθεί σε όλους τους τύπους των κυττάρων. Επίσης υπάρχουν και νεες MAP πρωτεΐνες που συνδέονται με την τουμπουλίνη όπως η σταθερού μονο-σωλινίσκου πολυπεπτίδιο (stable tubule-only polypeptide ,STOP) ή MAP-6 αλλά και η ενκοσίνη ή MAP-7.[7]

1.1.5.2 Πρωτεΐνες εντοπισμού (+) άκρου

Οι πρωτεΐνες εντοπισμού (+) άκρου (Microtubule plus-end-tracking proteins,+TIPs) είναι μόρια που παίζουν σημαντικό ρόλο στη δυναμική συσσώρευση στα περιφερικά άκρα της ανάπτυξης των μικροσωλινίσκων καθώς επίσης στη διαίρεση του κυττάρου και στην κίνηση. Οι TIPs πρωτεΐνες μπορούν να προκύψουν από την συγκεκριμένη προσκόλληση τους σε προσφάτως πολυμερισμένους μικροσωλινίσκους σε συνδυασμό με τον διαχωρισμό τους από το παλιότερο τμήμα των μικροσωλινίσκων ή μπορούν να προκύψουν από την κατευθυνόμενη μεταφορά ή

σύνδεση των πρωτεϊνών με άλλες +TIPs. Στις +TIPs πρωτεΐνες ανήκουν οι CLIP170 (Κυτταροπλασματικός-συνδετής πρωτεΐνης) καθώς επίσης και οι EB1, EB2, EB3p150Glued, Dynamitin, Lis 1CLIP115, CLASP1, CLASP2.[8]

1.1.5.3 Κινητικές Πρωτεΐνες

Οι μικροσωληνίσκοι μπορούν να δράσουν ως υπόστρωμα για τις κινητικές πρωτεΐνες συμβάλλοντας σημαντικά στην κίνηση και στη διαίρεση του κυττάρου. Αξιοποιούν την ενέργεια που παράγεται από την υδρόλυση της Τριφωσφορικής αδενοσίνης (adenosine triphosphate, ATP) με αποτέλεσμα να παράγεται μηχανικό έργο έτσι ώστε να προκαλεί κίνηση της πρωτεΐνης. Στις πιο σημαντικές κινητικές πρωτεΐνες που αλληλοεπιδρούν με τους μικροσωληνίσκους συμπεριλαμβάνεται η Κινεσίνη η οποία κινείται προς το (+) άκρο του μικροσωληνίσκου και η Δινείνη η οποία κινείται προς το (-) άκρο του μικροσωληνίσκου διαμέσου της αλληλεπίδρασης τους με την τουμπουλίνη. Μια ακόμη σημαντική κινητική πρωτεΐνη είναι η Μυοσίνη η οποία αλληλεπιδρά με την ακτίνη.

1.1.6. Πρωτεΐνες που προκαλούν αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων.

Η δυναμική των μικροσωληνίσκων είναι σημαντική για παραγωγή και τη δημιουργία της μιτωτικής ατράκτου καθώς κατά τη διάρκεια μετάβασης του κυττάρου από την μεσόφαση στη φάση της μίτωσης υπάρχει αύξηση της συχνότητας «καταστροφής» των μικροσωληνίσκων. Οι πρωτεΐνες που ρυθμίζουν την δυναμική τους ανήκουν σε δυο μεγάλες κατηγορίες: σε αυτές που προκαλούν σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων και περιλαμβάνουν τις MAP πρωτεΐνες, στις οποίες έγινε αναφορά προηγουμένως. Ενώ στην άλλη μεγάλη κατηγορία ανήκουν οι πρωτεΐνες που μπορούν να προκαλέσουν αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν πρωτεΐνες όπως η καταστροφίνη και η κατανίνη, που δεν ανήκουν στις MAP πρωτεΐνες εφόσον δεν συνδέονται απευθείας με τη τουμπουλίνη. Επίσης άλλες δυο πρωτεΐνες που έχουν την δυνατότητα να προκαλούν αποσταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων αλλά έχουν και τη δυνατότητα να συνδέονται με την τουμπουλίνη είναι η XKCM1 του είδους *Xenopus* η οποία είναι σχετιζόμενη με την Κινεσίνη και η Op 18-ογκοπρωτεΐνη 18 ή Σταθμίνη, η οποία παίζει σημαντικό ρόλο και στην τοπική σταθεροποίηση των μικροσωληνίσκων κοντά στο χρωμόσωμα κατά τη διάρκεια σχηματισμού της ατράκτου.[9.10]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η οικογένεια των σταθμινών περιλαμβάνει μια ομάδα συντηρημένων φωσφοπρωτεϊνών που εκφράζονται σε ποικίλα μέρη του ανθρώπινου σώματος, οι οποίες αφού δεχθούν σήμα από το εξωκυττάριο περιβάλλον συμβάλλουν στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης του κυττάρου. Η παρουσία τους εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ως φωσφορυλιωμένη ή ως μη φωσφορυλιωμένη μορφή και ενεργούν ως "σταθμός" ενοποίησης διαφορετικών ενδοκυττάρων οδών σηματοδότησης. Από τη λειτουργία τους αυτή ως σταθμός προτάθηκε και το όνομα σταθμίνη από τον καθηγητή Andre Sobel το 1989.

Στην οικογένεια ανήκουν η Σταθμίνη 1- Op18 (STMN1), η Σταθμίνη2 (STMN1)-SCG10 (Superior cervical ganglion-10), η Σταθμίνη 3-SCLIP (SCG10-like protein) και η RB3 μαζί με τις ισομορφές της RB3' και RB3''. Σε αντίθεση με την STMN 1 οι υπόλοιπες Σταθμίνες εκφράζονται μόνο στο Νευρικό Σύστημα. Τα επίπεδα έκφρασης των Σταθμινών μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του οργανισμού όσο και κατά την ωρίμανση του ΚΝΣ, αφού συμβάλλουν σημαντικά στην νευρωνική ωρίμανση.[11]

2.1 Σταθμίνη 1

Η Σταθμίνη είναι μια κυτταροπλασματική συντηρημένη φωσφοπρωτεΐνη μεγέθους 19 kDa η οποία λειτουργεί ως σταθμός εξωκυττάρων σημάτων μέσω διαφορετικών οδών σηματοδότησης. Το γονίδιο της βρίσκεται στον άνθρωπο στο χρωμόσωμα 1q36 και εκφράζεται κυρίως στον εμβρυικό και ενήλικα εγκέφαλο, στο νωτιαίο μυελό αλλά και στο θύμο αδέν, στους όρχεις, στον πλακούντα, στις ωοθήκες και στο έντερο. Η Σταθμίνη μπορεί να συναντάται και με τις εξής ονομασίες :Op18 ή 19 (Ογκοπρωτεΐνη), μεταβλαστίνη ή προσολίνη.[12.13]

Αποτελεί απαραίτητη ρυθμιστική πρωτεΐνη της δυναμικής των μικροσωλινίσκων του κυτταροπλάσματος κατά τη διαδικασία της μίτωσης, αναδομώντας το κυτταροσκελετό σύμφωνα τις ανάγκες του κυττάρου. Προωθεί τον αποπολυμερισμό των μικροσωλινίσκων εμποδίζοντας ή όχι τον πολυμερισμό της τουμπουλίνης. Οι μικροσωλινίσκοι πολυμερίζονται για να σχηματίσουν την μιτωτική άτρακτο ενώ στη φάση αυτή η λειτουργία της Σταθμίνης αναστέλλεται μέσω φωσφορυλίωσης για να αρχίσει η διαίρεση του κυττάρου. Η φωσφορυλίωση συμβαίνει κυρίως μέσω της Κινάσης A ή μέσω της Προλίνης –κατευθυνόμενη μέσω κινασών όπως η cdc 2 αλλά και μέσω MAP κινασών. [14.15.16].

Συγκεκριμένα οι κινάσες αυτές φωσφορυλιώνουν σε διαφορετικά σημεία της πρωτεΐνης όπως στη Σερίνη 16 από την CaM κινάση II και IV/G, στη Σερίνη 25 όπου είναι υπόστρωμα της MAPK σε απάντηση στο στρες και στους αυξητικούς παράγοντες διαφοροποίησης, στη Σερίνη 38 όπου είναι στόχος για το p34cdc2 και τέλος στη Σερίνη 63 για την κυκλική AMP Εξαρτώμενη Κινάση (PKA). Στη συνέχεια πρέπει να ενεργοποιηθεί ξανά με αποφωσφορυλίωση για να ολοκληρωθεί η διαίρεση εμποδίζοντας τον ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό του κυττάρου. Αυτή η ιδιότητα της, ότι μπορεί να οδηγήσει σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό της έδωσε και την ονομασία της ογκοπρωτεΐνης, όπως στις λευχαιμίες υπάρχει υπερέκφραση της Σταθμίνης.[17,18].

Η πρώτη προσπάθεια εξήγησης του μηχανισμού της δράσης της Σταθμίνης έγινε στη βάση ότι η πρωτεΐνη αυτή προωθεί τον αποπολυμερισμό και στη συνέχεια τον πολυμερισμό των μικροσωλινίσκων αυξάνοντας τον ρυθμό «καταστροφής». Ένας δεύτερος τρόπος εξήγησης δόθηκε στη συνέχεια στη βάση ότι ένα μόριο Σταθμίνης αλληλεπιδρά με δύο ελεύθερα μόρια διμερών α/β μη πολυμερισμένης τουμπουλίνης σχηματίζοντας T2S (Tubulin 2 Stathmin) σύμπλεγμα μέσω του κοινού τμήματος SLD (Stathmin- like Domain). Ο σχηματισμός αυτός εμποδίζει την ανάπτυξη των μικροσωλινίσκων, μη επιτρέποντας την τουμπουλίνη να πολυμεριστεί. Μια τρίτη μέθοδος ήρθε να ολοκληρώσει βασιζόμενη στο ότι η λειτουργία της Σταθμίνης ρυθμίζεται με βάση τις συνθήκες του pH, έτσι για να προαχθεί η «καταστροφή» απαιτείται το αμινοτελικό τμήμα της Σταθμίνης (N-terminal, NH) ενώ το καρβοξυλικό απαιτείται όταν έχουμε τη φάση της απομόνωσης της τουμπουλίνης από τη Σταθμίνη.[19,20,21]

2.2 Σταθμίνη 2-SCG10 (Superior Cervical Ganglion 10)

Η Σταθμίνη 2 αποτελεί τη δεύτερη πρωτεΐνη της ομάδας των Σταθμινών και σε αντίθεση με την Σταθμίνη 1 η οποία εκφράζεται παντού, η Σταθμίνη 2 εκφράζεται αποκλειστικά και μόνο στο Νευρικό Σύστημα κυρίως κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Παρουσιάζει ομοιότητα με τη Σταθμίνη 1 σε ποσοστό 69%. Φαίνεται πως μεταφέρεται διά μέσω των νευραξόνων και των δενδριτών, συσσωρεύεται στους αυξητικούς κώνους και είναι παρούσα στα τερματικά των ώριμων νευρώνων ενώ παίζει σημαντικό ρόλο στη νευρωνική διαφοροποίηση και στη δομική πλαστικότητα.

Ανήκει στην ομάδα των αυξητικών πρωτεϊνών (Growth Associated Proteins- GAPs) μόρια τα οποία είναι συνδεδεμένα με την νευρωνική ανάπτυξη. Η αύξηση των πρωτεϊνών αυτών συμβαίνει κατά τη διάρκεια της νευρογένεσης όταν όμως τα νευρωνικά δίκτυα σχηματιστούν η ανάπτυξη

τους σταματά απότομα. Στον ενήλικο εγκέφαλο παίζει σημαντικό ρόλο στη πλαστικότητα και στη δενδριτική αναδιαμόρφωση. [22,23]

2.3 Σταθμίνη 3-SCLIP(SCG10-like protein)

Η Σταθμίνη 3 ή SCLIP αποτελεί την τρίτη πρωτεΐνη της οικογένειας των Σταθμινών και εμφανίζει παρόμοιες δομικές και βιολογικές ιδιότητες και έχει 70% ομοιότητα με την Σταθμίνη 2. Εκφράζεται αποκλειστικά στο ΚΝΣ και ενώ η Σταθμίνη 1 και 2 εκφράζονται σε υψηλά επίπεδα κατά την εμβρυική και νεογνική κυρίως ηλικία και τα επίπεδα τους πέφτουν κατά την ενήλικη ζωή, η έκφραση της Σταθμίνης 3 αρχίζει από τα πρώτα στάδια της νεογνικής ηλικίας αλλά σε αντίθεση με τις άλλες δυο σταθμίνες τα επίπεδα της παραμένουν υψηλά και στη ενήλικη ζωή. [24,25]

2.3 Σταθμίνη 4- RB3 και οι ισόμορφές RB3' και RB3''

Η Σταθμίνη 4 αποτελεί την τέταρτη πρωτεΐνη της οικογένειας των Σταθμινών και ανευρίσκεται επίσης αποκλειστικά στο ΚΝΣ. όπως η Σταθμίνη 2 και η Σταθμίνη 3. Ανευρίσκεται επίσης και σε δύο άλλες ισόμορφές την RB3' και RB3'' και παρουσιάζει μεγαλύτερη ομοιότητα με την Σταθμίνη 3, εκφράζεται δηλαδή κυρίως στα ώριμα νευρικά κύτταρα και λιγότερο σε αυτά που βρίσκονται κατά τη διάρκεια της νευρωνικής διαφοροποίησης. Σε αντίθεση με την Σταθμίνη 2 και 3 οι οποίες εκφράζονται αποκλειστικά και μόνο στα κύτταρα των νευρώνων η RB3 εκφράζεται εκτός από τους νευρώνες και στα κύτταρα της γλοίας της λευκής ουσίας.

Η διαφορετική αλλά αλληλοκαληπτώμενη έκφραση της κάθε μορφής της οικογένειας των Σταθμινών προσδίδει στη καθεμιά ένα σημαντικό και συγκεκριμένο ρόλο διαμόρφωσή και ανάπτυξη του ΚΝΣ) [26,27,28].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Πολλαπλή Σκλήρυνση ή Σκλήρυνση Κατά Πλάκας (ΣΚΠ)

3.1 Εισαγωγή –Επιδημιολογία

Η Πολλαπλή Σκλήρυνση ή Σκλήρυνση Κατά Πλάκας αποτελεί μια αυτόνομη νόσο του ΚΝΣ στην οποία το ανοσοποιητικό σύστημα αναγνωρίζει ως ξένο πλέον το ίδιο του το σώμα και επιτίθεται στο Κ.Ν.Σ προσβάλλοντας τον εγκέφαλο και το νωτιαίο μυελό. Προκαλεί καταστροφή της μυελίνης και εστιακά στον ιστό γύρω από αυτήν δημιουργώντας τις λεγόμενες πλάκες –εστίες απομυελίνωσης. Το αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η παρουσία φλεγμονής και απομυελίνωσης και ο σχηματισμός ουλής προκαλώντας αποκοπή επικοινωνίας ανάμεσα στο ΚΝΣ και στο υπόλοιπο σώμα δημιουργώντας έτσι μια πληθώρα συμπτωμάτων ανάλογα με το σημείο εντοπισμού της εστιακής βλάβης. Τα συμπτώματα αυτά μπορεί να περιλαμβάνουν μυϊκή αδυναμία, προβλήματα όρασης, αίσθημα κόπωσης, προβλήματα βάδισης και κατάθλιψη

Η νόσος εκτιμάται ότι αφορά περίπου 2.3-2.5 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως και οι περισσότεροι άνθρωποι διαγιγνώσκονται σε ηλικίες ανάμεσα στα 20 και 50 έτη αλλά μπορεί να αφορά ακόμα και άτομα νεότερης ηλικίας. Προσβάλλει σε μεγαλύτερα ποσοστά τις γυναίκες από ότι τους άντρες ενώ παρουσιάζει και άνιση γεωγραφική κατανομή. Απαντάται κυρίως στη Καυκάσια φυλή όπου τα κρούσματα με καταγωγή από τη Βόρεια Ευρώπη ξεπερνούν τα 200 ανά 100.000 άτομα, ενώ τα κρούσματα στην υπόλοιπη Ευρώπη φθάνουν τα 80 ανά 100.000 άτομα. Στις υπόλοιπες φυλές τα ποσοστά είναι σημαντικά χαμηλότερα στη Νοτιοανατολική Ασία με κρούσματα δεν ξεπερνούν τα 2,8 ανά 100.000 άτομα ενώ στην Αφρική τα ποσοστά είναι ακόμη χαμηλότερα και αγγίζουν μόνο τα 0,5 κρούσματα ανά 100.000 άτομα. Η άνιση γεωγραφική κατανομή της ΣΚΠ και οι εθνικές διαφορές συνεχίζουν να υπάρχουν ακόμη και σήμερα καθιστώντας την ερμηνεία αυτού του φαινομένου ανεξήγητο [29,30].

Αξιοσημείωτο παραμένει επίσης το φαινόμενο που προκύπτει σε ότι αφορά τους μετανάστες και τη συχνότητα εμφάνισης της νόσου. Άνθρωποι που μεταναστεύουν από χώρες με χαμηλά ποσοστά εμφάνισης της ασθένειας σε χώρες με υψηλά ποσοστά τείνουν να διατηρούν τα ποσοστά της χώρας καταγωγής τους. Ενώ παράλληλα όταν παρατηρείται μετανάστευση από χώρες με υψηλά ποσοστά σε χώρες με χαμηλά ποσοστά οι άνθρωποι αυτοί προσαρμόζονται στα χαμηλά ποσοστά της χώρας που μεταναστεύουν. Ωστόσο τα ποσοστά αυτά δεν διατηρούνται ανάμεσα

στις γενιές, έτσι τα παιδιά των μεταναστών που προέρχονται από χώρες με χαμηλά ποσοστά και ζουν σε χώρες με υψηλά ποσοστά εμφανίζουν μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης της νόσου.(31)

Σημαντικές είναι και οι μελέτες που έχουν γίνει ώστε να καθορίσουν τη γενετική προδιάθεση της νόσου οι οποίες αποκαλύπτουν πως υπάρχει γενετική συμμετοχή. Η ύπαρξη κινδύνου εμφάνιση της νόσου σε συγγενείς πρώτου βαθμού ανέρχεται σε ποσοστό 4%. Σε μονοζυγωτικούς διδύμους το ποσοστό εμφάνισης ανέρχεται σε ποσοστό 26% εν σε διζυγωτικούς 2,4% [32].

3.2 Αιτιολογία

Τα ακριβή αίτια εμφάνισης της νόσου παραμένουν άγνωστα και ασαφή αλλά θεωρείται ότι αποτελείται από συνδυασμό ανοσολογικών, περιβαντολογικών και γενετικών παραγόντων ενώ είναι ακόμη υπό διερεύνηση και ο πιθανώς ρόλος των ιών, όπως ο ιός της ιλαράς, της ανεμοβλογιάς, ο ιός του απλού έρπητα, ο ιός Epstein Barr. Ο τρόπος με το οποίο αυτοί οι ιοί συνδέονται με την εμφάνιση της ΣΚΠ δεν έχει απόλυτα διαλευκανθεί αλλά θεωρείται πως μια κατάσταση όπως στρες, κούραση, άγχος, στεναχώρια μπορούν να προκαλέσουν επανενεργοποίηση αυτών των ιών με αποτέλεσμα τη διαταραχή λειτουργίας του ανοσοποιητικού με αποτέλεσμα την καταστροφή της μυελίνης και την εμφάνιση νευρολογικών συμπτωμάτων.[33]

Άλλοι παράγοντες που αυξάνουν το κίνδυνο εμφάνισης της νόσου είναι και οι γενετικοί όπως προαναφέρθηκε αν και δεν θεωρείται κληρονομική νόσος. Επίσης και η έλλειψη βιταμίνης D, η οποία λειτουργεί ως ρυθμιστής του ανοσοποιητικού συστήματος[34].

3.3.Παθοφυσιολογία της Σ.Κ.Π.

Η παθοφυσιολογία της νόσου βασίζεται στη άμεση εμπλοκή και συμμετοχή του ανοσοποιητικού συστήματος με αποτέλεσμα την εστιακή καταστροφή της μυελίνης, των νευρικών κυττάρων την παρουσία φλεγμονής, το σχηματισμό ουλής και την καταστροφή νευραξονων.

Το κύριο χαρακτηριστικό της νόσου είναι η απεικόνιση των λεγόμενων πλακών κατά τη διάρκεια της Μαγνητικής Τομογραφίας (MRI). Οι πλάκες προσβάλλουν κυρίως τη λευκή ουσία, το οπτικό νεύρο, τα βασικά γάγγλια αλλά και το νωτιαίο μυελό. Ιστοχημικές μελέτες εγκεφάλου

ανθρώπων που είχαν προσβληθεί με ΣΚΠ καταδεικνύουν την παρουσία αυτών των πλακών κατατάσσοντας τες ανάλογα με το βαθμό καταστροφής σε οξείες, χρόνιες, χρόνιες σιωπηλές και τελικά τον σχηματισμό ουλής.

Παρατηρείται αθρόα εισβολή T-λεμφοκυττάρων, διά μέσω των αγγείων αφού προηγείται το άνοιγμα του αιματοεγκεφαλικού φραγμού, μονοκυττάρων και μακροφάγων καθώς και των B-λεμφοκυττάρων, την έκφραση του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας τύπου II(MHC II),τη λειτουργία των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων αλλά και την απώλεια ώριμων ολιγοδενδροκυττάρων. Επίσης παρατηρείται και ενεργοποίηση άλλων γλοιακών κυττάρων όπως συσώρευση αστροκυττάρων και μικρογλίας γύρω από την φλεγμονή. Αυτές οι διεργασίες έχουν σαν αποτέλεσμα την απώλεια μυελίνης και την καταστροφή νευραξόνων [33,35,36].

Σημαντική είναι και παρουσία των κυτταροκινών και ο ρυθμιστικός τους ρόλος στη φλεγμονή, οι οποίες χωρίζονται στις προ-φλεγμονώδεις (IL-1β,TNFα,IFNγ) και αντι-φλεγμονώδεις (IFNα/β, TGF-β, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10). Τα ενεργοποιημένα T βοηθητικά λεμφοκύτταρα CD 4+(T-helper,Th cells) χωρίζονται σε δύο κατηγορίες τα Th1 κύτταρα που παράγουν μεγάλες ποσότητες προφλεγμονοδών κυττάρων και προωθούν την κυτταρική ανοσία και τα Th2 κύτταρα τα οποία παράγουν αντιφλεγμονώδεις κυτταροκίνες και προωθούν την χυμική ανοσία. Έκφραση των Th1 κυττάρων στη ΣΚΠ παρατηρείται κατά την υποτροπή της νόσου ενώ τα Th2κατα την ύφεση της νόσου[37] . Μια ακόμη κατηγορία των Th κυττάρων φαίνεται πως συμβάλει σημαντικά στην εξέλιξη της φλεγμονής, είναι τα Th17(IL-17) κατηγορία που όπως και τα Th1 και τα Th2 χρειάζονται συγκεκριμένες κυτταροκίνες για να ενεργοποιηθούν όπως την TGF-β σε συνδυασμό με την IL-6 και την IL -23. Τα επίπεδα των κυτταροκινών που συνδέονται με την παρουσία των Th17 κυττάρων ανευρίσκονται κατά τη διάρκεια της έξαρσης της νόσου σημαντικά αυξημένα[38].

Ωστόσο όλες αυτές οι ιστολογικές και ανοσολογικές μεταβολές δεν συμβαίνουν μόνο στο σημείο της παρουσίας της φλεγμονής αλλά παρατηρούνται αλλοιώσεις και μεταβολές και στο φαινομενικά υγιή γειτονικό ιστό (normal appearing white matter -NAWM) ενώ η εμφάνιση των πλακών δεν περιορίζεται μόνο στη λευκή ουσία αλλά μπορούν να εμφανιστούν και στη φαιά ουσία.

Η παρουσία της φλεγμονής στο ΚΝΣ έχει σαν αποτέλεσμα και τη καταστροφή των νευραξόνων όπου στις ενεργείς φλεγμονές παρατηρείται μεγαλύτερη αποκοπή και καταστροφή νευραξόνων ενώ παρατηρούνται και καταστραμμένοι νευράξονες και στο NAWM [39]. Ο μηχανισμός με τον οποίο συντελείται η καταστροφής τους δεν είναι απόλυτα γνωστός ωστόσο η συμβολή των κυτταριτοξικών CD 8+ κυττάρων θεωρείται σημαντική αφού απελευθερώνουν κυτταροτοξικά μόρια και προωθούν την απόπτωση[40].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

Πειραματική Αυτόανωση Εγκεφαλομυελίτιδα (ΠΑΕ)

4.1.Πειραματικά μοντέλα της ΠΑΕ

Η ΠΑΕ αποτελεί το πειραματικό μοντέλο έκφρασης της ΣΚΠ, σύμφωνα με το οποίο μπορεί να προκληθεί ενεργοποίηση του ανοσιακού συστήματος. Ωστόσο το μοντέλο αυτό μπορούν να μιμηθούν μόνο τα συμπτώματα της νόσου και δεν αποτελούν απόλυτη έκφραση της, γι' αυτό δεν μπορούμε να πούμε πως υπάρχει ιδανικό πειραματικό μοντέλο, παρόλα αυτά παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη νόσο σε πειραματικό επίπεδο.

Για την πρόκληση της ΠΑΕ χρειάζεται να χρησιμοποιηθούν κάποιοι παράγοντες ως αντιγόνα ή ομογενοποιημένα τμήματα του ΚΝΣ, πρωτεΐνες έναντι της μυελίνης (MOG, PLP, MBP) ή πεπτίδια. Το κατάλληλο γενετικό περιβάλλον και η χρήση κατάλληλων ανοσοενισχυτικών για τη διάνοξη του αίματος –εγκεφαλικού φραγμού καθώς και η ηλικία και το φύλο του πειραματόζωου είναι σημαντικοί παράγοντες για την επιλογή μοντέλου.

Η ΠΑΕ εμφανίζει δύο κλινικούς τύπους την οξεία και χρόνια ΠΑΕ, στην οξεία παρατηρείται έντονη φλεγμονώδη και απομυελυνωτική διεργασία, στην οποία τα πειραματόζωα αν δεν καταλήξουν μπορούν να αναρρώσουν πλήρως και στη χρόνια ΠΑΕ παρατηρείται παρουσία φλεγμονής και απομυελίνωσης αλλά εδώ δεν παρατηρείται ίαση μόνο εμφανίζεται ποικίλου βαθμού αναπηρία. Η χρόνια ΠΑΕ εκδηλώνεται με δύο μορφές την υποτροπιάζουσα στην οποία παρατηρούνται εξάρσεις και υφέσεις (υποτροπές) και την χρόνια προϊούσας ή σταθερή όπου παρατηρείται μια σχετικά σταθερή κλινική πορεία. Η χρόνια μορφή της ΠΑΕ μπορεί να προκληθεί σε μύες C57BL/6 με δύο εγχύσεις MOG σε γαλάκτωμα Complete Freund's Adjuvant (CFA-προκαλεί ενίσχυση της ανοσοποίησης) μέσα σε διάστημα δύο εβδομάδων [41,42)].

Η ΠΑΕ επίσης χαρακτηρίζεται και από δύο τύπους επαγωγής την ενεργητική και την παθητική ή εκ μεταφοράς. Στο μοντέλο της ενεργητικής ΠΑΕ το πειραματόζωο παράγει τα δικά του Τ-λεμφοκύτταρα έναντι της χορηγούμενης πρωτεΐνης της μυελίνης. Χρησιμοποιούνται θηλυκοί μύες 6-8 εβδομάδων στα οποία γίνεται υποδόρια έγχυση μιας πρωτεΐνης της μυελίνης γαλακτωματοποιημένη σε CFA ενώ τις επόμενες μέρες γίνεται και μια επιπλέον ένεση με τοξίνη κοκκύτη (toxin pertussis) για την διάνοξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού και μέσα σε 2-3 εβδομάδες εμφανίζονται τα κλινικά συμπτώματα της ΠΑΕ. Αντίθετα στην παθητική ΠΑΕ το πειραματόζωο δεν παράγει από μόνο του τα λεμφοκύτταρα αλλά τα προσλαμβάνει από άλλο πειραματόζωο το οποίο έχει ενεργοποιηθεί και αναπτύξει την ΠΑΕ μετά από χορήγηση κάποιας μυελικής πρωτεΐνης. Στη συνέχεια τα λεμφοκύτταρα του αφαιρούνται κάτω από ειδικές

διαδικασίες ώστε να χορηγηθούν στο πρώτο πειραματόζωο και να προκληθεί η παθητική ΠΑΕ [43].

Επίσης το μοντέλο cuprizone αποτελεί μοντέλο τοξικής απομυελίνωσης, το οποίο προκαλεί θάνατο των ολιγοδενδροκυτταρων και ακολουθεί αναστρέψιμη απομυελίνωση, φαινόμενο που παρατηρείται εντός 4 εβδομάδων από τη χορήγηση της cuprizone [44].

Στα πειραματικά μοντέλα ανήκει και η ιογενής Εγκεφαλομυελίτιδα των μυών με τη χορήγηση του ιού Theiler (Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus -TMEV) . Στελέχη του ιού της ηπατίτιδας μπορούν να χρησιμοποιηθούν και να προκαλέσουν τη ΠΑΕ[45].

4.2 Κλινική ανάλυση της ΠΑΕ.

Η κλινική εμφάνιση της νόσου πραγματοποιείται ύστερα από ένα διάστημα λανθάνουσας περιόδου και κατόπιν έχουμε την εμφάνιση των νευρολογικών συμπτωμάτων. Συγκεκριμένα παρατηρείται αρχικά απώλεια βάρους του πειραματόζωου και κατόπιν 1-2 μέρες μετά εμφανίζονται και τα κλινικά συμπτώματα. Το μέγιστο κλινικό σκορ παρατηρείται 5-6 μέρες μετά την έναρξη των κλινικών συμπτωμάτων ανάλογα με το το μοντέλο που έχει χρησιμοποιηθεί.

Οι επίμυες και οι μύες παρουσιάζουν παρόμοια κλινικά συμπτώματα, με μια παρατηρούμενη παράλυση η οποία ξεκινά από τη άκρη της ουράς και επεκτείνεται προς τα οπίσθια άκρα και πρόσθια άκρα. Η κλινική εμφάνιση εκτιμάται με βάση μια κλίμακα βαθμολόγησης από το «0» ως το «6»,το 0 αντιστοιχεί σε φυσιολογικό πειραματόζωο και το 6 σε θάνατο.

Η ΠΑΕ προσφέρει πληροφορίες οι οποίες είναι πολύ σημαντικές σε ότι αφορά τη ΣΚΠ αν και θεωρείται ένα μοντέλο μίμησης σε ότι αφορά την νόσο, αφού η βασική διαφορά της με την ΣΚΠ είναι ότι η ΠΑΕ προκαλείται από μία γνωστή εγκεφαλιτιδογόνο ουσία. Ωστόσο η ΠΑΕ είναι ένα μοντέλο που μπορεί να δεχθεί βελτιώσεις έτσι ώστε να υπερνικήσει τα μειονεκτήματα της. Έτσι τα μοντέλα της ΠΑΕ που χρησιμοποιούνται σήμερα μπορούν να προσφέρουν πληροφορίες σε ότι αφορά τη θεραπεία, τη παθογένεια, την άνοσο –απάντηση, την επίδραση του στρες ,γενετικές ,πληροφορίες ή πληροφορίες για την κυτταρική αναδόμηση. Η ΠΑΕ παρόλα αυτά παραμένει ένα μοντέλο που εμφανίζει παρόμοια κλινικά και παθολογικά στοιχεία με την ΣΚΠ.

Η παθητική ΠΑΕ αποτελεί ένα χρήσιμο μοντέλο όταν θέλουμε να μελετήσουμε την παρουσία και την κινητικότητα των Th1 και Th17 κυττάρων, τα οποία έχουν άμεση εμπλοκή με την παθογένεση της ΣΚΠ. Το μοντέλο της ενεργητικής ΠΑΕ το οποίο χρησιμοποιείται ευρέως είναι αυτό με τη χορήγηση της πρωτεΐνης MOG₃₅₋₅₅ ως εγκεφαλιτιδογόνο γιατί αποτελεί ένα σχετικά

φθηνό και σύντομο χρονικά μοντέλο, προσφέρει μεγάλο θεραπευτικό παράθυρο ,δίνοντας μια πρώτη ένδειξη για πιθανές θεραπείες στη ΣΚΠ. Επίσης προσφέρει μια οξεία φάση και ακολουθεί μερική ή ολική ανάρρωση ενώ άλλα μοντέλα δίνουν πολλές εξάρσεις και υφέσεις ή οδηγούν σε χρόνια παράλυση .Στο μοντέλο αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί προφυλακτική αγωγή-πριν την έναρξη της νόσου από τη μέρα της ανοσοποίησης, ημιθεραπευτική αγωγή η οποία αρχίζει τη μέρα 10 μετά την ανοσοποίηση ή και θεραπευτική αγωγή-μόλις εμφανιστεί το πρώτο σύμπτωμα. Το σημαντικότερο όλων αποτελεί το γεγονός ότι από το μοντέλο της ΠΑΕ μπορούμε να συλλέξουμε στοιχεία τα οποία δεν μπορούμε να πάρουμε από κάποιον που νοσεί με την ΣΚΠ ,παρα μόνο όταν είναι διαθέσιμο νεκροτομικό υλικό, με τον κατάλληλο σχεδιασμό του μοντέλου της ΠΑΕ τα στοιχεία αυτά είναι πιο κοντά στην αλήθεια [46,47,48.49].

Σκοπός της παρούσας μελέτης

Η οικογένεια των σταθμινών περιλαμβάνει μια ομάδα συντηρημένων φωσφοπρωτεϊνών που εκφράζονται σε ποικίλα μέρη του ανθρώπινου σώματος, οι οποίες αφού δεχθούν σήμα από το εξωκυττάριο περιβάλλον συμβάλλουν στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης του κυττάρου. Η παρουσία τους εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα ως φωσφορυλιωμένη ή μη φωσφορυλιωμένη μορφή και ενεργούν ως "σταθμός" ενοποίησης διαφορετικών ενδοκυττάρων οδών σηματοδότησης.

Πρόκειται για πρωτεΐνες που συνεχώς εναλλάσσονται μεταξύ της συναρμολόγησης και αποσυναρμολόγησης του κυττάροσκελετού με πρωταρχικό σκοπό τον ορθό σχηματισμό της μιτωτικής ατράκτου.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να γίνει μια ενδελεχής ανάλυση της παρουσίας της οικογένειας των Σταθμινών σε μοριακό και πρωτεϊνικό επίπεδο στο πειραματικό μοντέλο της ΠΑΕ στο ΚΝΣ, της κινητικότητάς τους και των μεταβολών που συμβαίνουν στα διάφορα στάδια της νόσου. Επίσης πραγματοποιήθηκε έλεγχος ώστε να εντοπιστούν τα κύτταρα τα οποία εκφράζουν τις Σταθμίνες και αν αυτά συνεχίζουν ή όχι να εκφράζουν τις πρωτεΐνες παρουσία της ΠΑΕ.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Πειραματόζωα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 30 Θηλυκοί μύες της φυλής C57BL/6, ηλικίας 8-10 εβδομάδων και βάρους 18-20gr. Τα πειραματόζωα προέρχονταν από το Ινστιτούτο Παστέρ Αθηνών και συντηρήθηκαν στο εργαστήριο Πειραματικής Νευρολογίας και Νευροανοσολογίας της Β' Νευρολογικής Κλινικής του Α.Π.Θ σε ειδική αίθουσα πειραματόζωων με προδιαγραφές ασφάλειας επιπέδου 2 (Αριθμός εγκατάστασης ΑΔΑ: ΒΠΩ7ΛΛ-ΓΜΠ). Ο χώρος αυτός έχει ελεγχόμενο φωτισμό δωδεκάωρης εναλλαγής, ελεγχόμενης θερμοκρασίας, πίεσης, εξαερισμού (μέσω φίλτρων hepa) και είναι ελεύθερος παθογόνων. Τα πειραματόζωα, σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού σιτίζονταν ένα τυπικό διαιτολόγιο (18% πρωτεΐνη) και τους χορηγούνταν νερό ελεύθερου αντιβιοτικών.

Όλες οι πειραματικές διαδικασίες εφαρμόστηκαν σύμφωνα με την οδηγία του Ευρωπαϊκού κοινοβουλίου και του συμβουλίου σχετικά με την προστασία των ζώων που χρησιμοποιούνται για επιστημονικό σκοπό (2010/63/ΕΕ) ακολουθούμενη από την συμμόρφωση σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία (ΠΔ56/2013). Το πρωτόκολλο πειραματισμού έχει αδειοδοτηθεί από την Περιφέρεια Θεσσαλονίκης, Διεύθυνση Κτηνιατρικής Υπηρεσίας με αριθμό 25951/143.

5.2 Επαγωγή χρόνιας ΠΑΕ

Η επαγωγή της χρόνιας ΠΑΕ επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας το γραμμικό πεπτίδιο της πρωτεΐνης MOG₃₅₋₅₅ (Sigma). Την ημέρα επαγωγής της νόσου (ημέρα 0) πραγματοποιήθηκε υποδόρια έγχυση 0,15mg γραμμικής MOG στη βάση της ουράς κάθε πειραματοζώου. Η MOG ήταν διαλυμένη σε 100μL ατελούς Freund's συμπληρώματος (IFA, Sigma) στο οποίο είχε προστεθεί μυκοβακτηρίδιο της φυματίωσης H37Ra (4mg/mL IFA, Difco) και 100μL ρυθμιστικού διαλύματος PBS (Phosphate Buffer Saline). Την ίδια μέρα χορηγήθηκαν επίσης 400ng/πειραματόζωο της τοξίνης Pertussis (Sigma) διαλυμένης σε 500μL PBS ενδοπεριτοναϊκά για τη διένεξη του αιματοεγκεφαλικού φραγμού. Την 2η ημέρα από την επαγωγή, χορηγήθηκε ενισχυτικά η μισή ποσότητα της τοξίνης Pertussis της αρχικής δόσης, δηλαδή 200ng/πειραματόζωο διαλυμένης σε 500μL PBS, ενδοπεριτοναϊκά. Την 7η ημέρα από την

επαγωγή, έγινε επαναληπτική χορήγηση της αρχικής δόσης γραμμικής MOG ενισχυτικά, στη βάση της ουράς των πειραματόζων.

5.3 Κλινική εξέταση πειραματόζων

Η κλινική εξέταση πραγματοποιούνταν καθημερινά χρησιμοποιώντας την κλίμακα κλινικής εξέτασης της ΠΑΕ:

0: Κανένα κλινικό σημείο. Η ουρά ανέρχεται κάθετα ως προς τον οριζόντιο άξονα του πειραματόζου και παραμένει σε αυτή τη θέση ακόμα και μετά από άσκηση πίεσης στον αυχένα.

1: Η ουρά βρίσκεται στο οριζόντιο επίπεδο μετά από άσκηση πίεσης στον αυχένα.

2: Παράλυση της ουράς και έλλειψη κινητικότητάς της.

3: Το 2 και παντελής αδυναμία του πειραματόζου να επανέλθει στα τέσσερα άκρα, όταν αυτό ανατρέπεται και τοποθετείται στη ράχη του.

4: το πειραματόζωο κινείται με τα πρόσθια άκρα, ενώ παρατηρείται αδυναμία των δύο οπισθίων. Συχνά πραγματοποιούνται αμυδρές διαλείπουσες κινήσεις των άκρων αυτών χωρίς όμως να συμβάλλουν στη κίνηση του πειραματόζου.

5: Τα δύο οπίσθια άκρα χάνουν παντελώς την κινητικότητα τους με έντονη μυϊκή ατροφία στα άκρα αυτά και στους οπίσθιους μύες της ράχης. Παρατηρείται ακόμη παράλυση των πρόσθιων άκρων. Το πειραματόζωο εμφανίζει αδυναμία μετακίνησης από την θέση του ενώ σπάνια επανέρχεται στη φυσιολογική κλινική του κατάσταση.

6: Θάνατος του πειραματόζου.

Παράλληλα με την κλινική παρακολούθηση ,καταγράφηκαν και οι μεταβολές των βαρών των πειραματόζων σε όλη τη διάρκεια του πειραματισμού.[53]

5.4 Θυσία πειραματόζων και συλλογή ιστών

Ανάλογα με το είδος της μετέπειτα πειραματικής ανάλυσης που είχε σχεδιαστεί επιλέχθηκε η βέλτιστη μέθοδος θυσίας των πειραματόζων Η διακαρδιακή διήθηση και μονιμοποίηση με παραφορμαλδεΰδη (PFA,Panreac) (4% σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS) είναι η βέλτιστη μέθοδος για τομές κρυοστάτη και μελέτη της ιστοπαθολογίας, ενώ η άμεση θυσία και ταχεία ψύξη των ιστών είναι η ακολουθούμενη μέθοδος για τη μοριακή ανάλυση.

Για την ιστοπαθολογική ανάλυση του πειράματος, τα πειραματόζωα αναισθητοποιήθηκαν σε περιβάλλον κορεσμένο από αιθέρα και η αναισθησία εκτιμήθηκε με έλεγχο αντανακλαστικού της κινητικότητας των δακτύλων των πρόσθιων και οπίσθιων άκρων. Στη συνέχεια τα πειραματόζωα ακινητοποιήθηκαν σε ύπτια θέση πάνω σε τεμάχιο συμπαγούς φελλού. Ακολούθησε διάνοιξη των θωρακικών τοιχωμάτων για την αποκάλυψη της καρδιάς. Βελόνα διαμέτρου 16G συνδεδεμένη με σύστημα ορών τοποθετήθηκε στην αριστερή κοιλία της καρδιάς και το πειραματόζωο διηθήθηκε με 5mL διαλύματος 1x PBS ενώ παράλληλα πραγματοποιήθηκε τομή του δεξιού κόλπου της καρδιάς δημιουργώντας τεχνητά ένα ανοιχτό σύστημα κυκλοφορίας για την απομάκρυνση των ερυθρών. Στη συνέχεια αντικαταστάθηκε το PBS με διάλυμα 4% PFA (4% Παραφορμαλδεΰδη σε 1x PBS) και το πειραματόζωο διηθήθηκε με 50mL PFA και αφού προκάλεσε μονιμοποίηση εξήρθε του ανοιχτού δεξιού κόλπου. Στη συνέχεια αφαιρέθηκαν τα όργανα ενδιαφέροντος, εγκέφαλος και νωτιαίος μυελός, μεταφέρθηκαν σε διάλυμα 4% PFA και επώαστηκαν ολονύχτια στους 4°C για την περαιτέρω μονιμοποίηση τους. Την επομένη ημέρα το διάλυμα αντικαταστάθηκε με διάλυμα 30% σουκρόζης (Panreac) σε PBS και διατηρήθηκαν στους 4°C ωσότου οι ιστοί καταβυθιστούν (συνήθως 3-4 ημέρες). Τέλος οι ιστοί ψυχθήκαν με τη βοήθεια ισοπεντανίου (AcrosOrganics σε υγρό άζωτο. Οι ιστοί κόπηκαν με τη βοήθεια μηχανήματος κρυοστάτη (Slee cryostat mtc) και τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρες πλάκες Super Frost Plus (MENZEL-GLASER) σε πάχος 6μm.

Όσα από τα πειραματόζωα προορίστηκαν για μοριακή ανάλυση με τη μέθοδο real-time PCR αναισθητοποιήθηκαν με αιθέρα, θυσιάστηκαν και οι ιστοί απομονώθηκαν και υπέστησαν ταχεία ψύξη σε υγρό άζωτο ενώ αποθηκεύτηκαν στους -80°C έως την περαιτέρω επεξεργασία τους.

5.5 Μοριακή ανάλυση της έκφρασης των Σταθμινών

5.5.1 Απομόνωση ολικού RNA

Η απομόνωση ολικού RNA πραγματοποιήθηκε από το νωτιαίο μυελό με τη χρήση TRI της εταιρείας Ambion σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Αναλυτικά για κάθε 10 mg ιστού προστέθηκαν 800 μl TRI και ο ιστός τεμαχίστηκε με νυστέρι και ομογενοποιήθηκε με τη χρήση σύριγγας με 21g βελόνα. Μετά την ολοκλήρωση της ομογενοποίησης το μείγμα επώαστηκε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκαν 200 μl/ml TRI

χλωροφορμίου(Merck) και έντονη ανάδευση (vortex) για 15 δευτερόλεπτα. Αφού το μείγμα χλωροφορμίου επωαστεί για 5-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Ακολουθήθηκε φυγοκέντρωση στα 12.000 χ g στους 4°C για 15 λεπτά. Στο τέλος της φυγοκέντρωσης προέκυψαν τρεις φάσεις: η κάτω, η οργανική φάση, η μέση ημιδιαφανής φάση, στην οποία υπάρχει διαλυμένο το DNA, και η επάνω διαυγής φάση τμήμα το οποίο περιέχει το RNA (υδατική φάση). Μεταφέρθηκε η υδατική φάση σε καινούριο σωληνάριο και προστέθηκαν 0,5 μl/ml TRI ισοπροπανόλης (Panreac) και το δείγμα επωάζεται για περαιτέρω 5-15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί και πάλι φυγοκέντρωση στα 12.000 χ g στους 4°C για 8 λεπτά από όπου προκύπτει ένα λευκό ίζημα το οποίο περιέχει το RNA. Στη συνέχεια αφαιρέθηκε το υπερκείμενο και προστέθηκε 1 ml 75% αιθανόλης και φυγοκεντρήθηκε στα 7.500 χ g στους 4°C για 5 λεπτά. Για μία επιπλέον φορά αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, τα σωληνάρια αφέθηκαν ανοιχτά για περίπου 3-5 λεπτά για να ενισχυθεί η εξάτμιση της αιθανόλης. Τέλος το ίζημα ανασυστάθηκε σε 60μl νερό ελεύθερο νουκλεασών. Η ποσότητα καθώς και η καθαρότητα του RNA πιστοποιήθηκε σπεκτροφωτομετρικά.

5.5.2 Σύνθεση cDNA

Το RNA που θα εξάχθηκαν μετατράπηκαν σε συμπληρωματικό DNA (cDNA) με τη χρήση του εμπορικού διαθέσιμου κιτ Iscript cDNA kit (Biorad 170-8891). Οι αντιδράσεις είχαν τελικό όγκο 20 μl και αναλυτικά οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αντίδραση ήταν 4 μl Iscript buffer, 5 μl νερό, 1 μl ανάστροφη μεταγραφάση και 1μg/10 μl από το δείγμα RNA.

Το πρωτόκολλο που θα ακολουθήθηκε ήταν: 5 λεπτά στους 25°C , 60 λεπτά στους 42 °C και 5 λεπτά στους 85 °C.

5.5.3 PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR)

Ημιοσοτική PCR πραγματικού χρόνου για τα γονίδια Σταθμίνη 1, 2 και 3 (stathmin-1, SCG10 και SCLIP) χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς τη b-actin. Η PCR πραγματικού χρόνου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα θερμοκυκλοποιητή Biorad IQ5 iCycler. Οι αντιδράσεις διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας 2x Master Mix SYBR kit (Biorad).

Η αντίδραση περιελάμβανε 10μl του κύριου μίγματος, 0,4μl εκάστου εκκινητή (10pmol), 1μl cDNA και νερό ελεύθερο νουκλεασών έως τα 20μl. Οι συνθήκες της PCR ήταν 95°C για 10 λεπτά,

ακολουθούμενη από 40 κύκλους των 94°C για 30 δευτερόλεπτα, 60°C για 30 δευτερόλεπτα και 72°C για 30 δευτερόλεπτα, και ένα τελικό στάδιο των 72°C για 5 λεπτά. Η ανάλυση της καμπύλης τήξης του κάθε ενισχυμένου προϊόντος PCR επέτρεπε να ελεγχθεί η ειδικότητα της ενίσχυσης. Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παραθέτονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1). Τα αποτελέσματα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας την ΔΔCt μέθοδο. Τέλος τα προϊόντα πολλαπλασιασμού διαχωρίστηκαν και οπτικοποιήθηκαν σε 2% γέλη αгарόζης.

Γονίδιο	Forward εκκινητής	Reverse εκκινητής	Μέγεθος προϊόντος
Stathmin-1	5'- CGCAAGTCTCATGAGGCGGAA-3'	5'- CTTGTCCTTCTCTCGCAAGCGC-3'	204bp
SCG-10	5'- GCAATGGCCTACAAGGAAAA-3'	5'- GGTGGCTTCAAGATCAGCTC-3'	170 bp
SCLIP	5'-CAGCACCGTATCTGCCTACA-3'	5'-AGCCTCCTGAGTCTTCCTCC-3'	298 bp
β-actin	5' 'TGTAACCAACTGGGACGATATGC 3'	5'GATCTTGATCTTCATGATGCTAGG 3'	139 bp

Πίνακας 1: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση της έκφρασης των Σταθμινών στο νωτιαίο μυελό.

5.6 Τεχνικές Ιστοχημείας και Ανοσοιστοχημείας

5.6.1 Ιστοχημικές χρώσεις

5.6.1.1 Αιματοξυλίνης-Εωσίνης

Η χρώση της Αιματοξυλίνης-Εωσίνης (A&E) έγινε σε τομές 6μm όπως περιγράφεται συνοπτικά ακολούθως. Οι τομές τοποθετήθηκαν σε απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά και στη συνέχεια στο διάλυμα αιματοξυλίνης (Hematoxylin Harris, Merck) για 10 λεπτά. Ακολούθως τοποθετήθηκαν σε τρεχούμενο νερό βρύσης και παρέμειναν σε αυτό για άλλα 10 λεπτά.

Η διαφοροποίηση έγινε σε διάλυμα οξικής αλκοόλης (0,25ml HCl / 100ml 70% αλκοόλη) για 30-60 δευτερόλεπτα και στη συνέχεια ξέπλυμα σε τρεχούμενο νερό βρύσης για περίπου 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια, οι αντικειμενοφόρες πλάκες με τις τομές επώστηκαν για 2 περίπου λεπτά σε διάλυμα εωσίνης (Panreac), ξεπλύθηκαν σε νερό βρύσης για 5 λεπτά και τελικά αφυδατώθηκαν στην αντίστροφη σειρά βαθμιδούμενων διαλυμάτων αλκοόλης (50%, 70%, 95% επί 2 φορές,

εμβαπτίσεις) και ξυλόλης και καλύφθηκαν με καλυπτρίδα αφού τοποθετήθηκε μια σταγόνα Entellan (Merck). Το αποτέλεσμα της χρώσης είναι να σημαίνει το κυτταρόπλασμα: ροζ και τους πυρήνες: μπλε.

5.6.1.2 Luxol Fast Blue

Η χρώση της Luxol Fast Blue (LFB) έγινε σε τομές κρυοστάτη 6μm ως εξής: Οι τομές τοποθετήθηκαν σε απεσταγμένο νερό για 5 λεπτά και στη συνέχεια σε διάλυμα 0,1% LFB (0,1gr LFB σε 100ml 95% αιθανόλη και 0,5ml οξικού οξέος) και οι τομές επώαστηκαν ολονύκτια στους 56°C.

Την επόμενη μέρα τοποθετήθηκαν σε 96% αιθανόλη για 1 λεπτό, εμβαπτίστηκαν σε απεσταγμένο νερό για 1 λεπτό και διαφοροποιήθηκαν για 5 δευτερόλεπτα σε διάλυμα 0,025% Ανθρακικού λίθιου (Li_2CO_3). Άμεση μεταφορά των τομών σε 70% αιθανόλη για 30 δευτερόλεπτα, ακολουθούμενη από μία δίλεπτη πλύση σε απεσταγμένο νερό και αντιχρώση τους με επώαση 30 λεπτών σε διάλυμα 0,1% Nuclear Fast Red (0,1gr Nuclear Fast Red, Sigma, με 5gr Aluminum sulfate, Sigma, σε 100ml απεσταγμένο νερό). Πλύσιμο ενός λεπτού σε απεσταγμένο νερό, ταχεία αφυδάτωση των τομών σε 70% και 96% αιθανόλη (30 δευτερόλεπτα έκαστη) και στη συνέχεια επώαση σε διαλύματα ξυλόλης (2 διαλύματα, από 5 λεπτά στο καθένα). Κλείσιμο των τομών με καλυπτρίδα και Entellan. Το αποτέλεσμα της χρώσης είναι να σημαίνεται η μυελίνη με ανοιχτό μπλέ-γαλάζιο και οι πυρήνες των κυττάρων κόκκινοι.

5.6.2 Ανοσοιστοχημικές χρώσεις

5.6.2.1 Ανοσοιστοχημεία οπτικού μικροσκοπίου

Οι τομές κρυοστάτη αφού βγήκαν από τον καταψύκτη -80°C αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 ώρα και κατόπιν τοποθετήθηκαν για ενυδάτωση σε απεσταγμένο νερό για 5'.

Ακολούθησε αναστολή της ενδογενούς υπεροξειδάσης σε διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 3% σε μεθανόλη για 10 λεπτά και ξέπλυμα των τομών με απεσταγμένο νερό 2 φορές επί 5') ενώ στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS (Tris Buffer Saline)

Ο αποκλεισμός των μη-ειδικών αντιγονικών θέσεων στον ιστό έγινε με επώαση με διάλυμα 10% βόειου εμβρυϊκού ορού (Fetal Bovine Serum, FBS, Gibco) 10% σε ρυθμιστικό διάλυμα TBS 30 λεπτά.

Τα πρώτα αντισώματα, διαλύθηκαν σε διάλυμα 10% FBS σε TBS, εφαρμόστηκαν στις τομές και επώαστηκαν ολονύκτια στους 4°C. Χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες συγκεντρώσεις αντισωμάτων: αντι-CD3, (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, Thermo Scientific, διάλυση 1:200) και αντι-stathmin-1, (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:500), αντι-SCG10, (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100), αντι-SCLIP, (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100).

Μετά το ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBS (3x3 λεπτά έκαστο) εφαρμόστηκε ένα δεύτερο βιοτυνυλιωμένο αντίσωμα αντι-κονίκλου (Santa-Cruz, διάλυση 1:200) και επώαστηκε για 1 ώρα.

Οι τομές ξεπλύθηκαν σε διάλυμα TBS (3x5 λεπτά έκαστο) και ακολούθησε επώαση με το σύστημα της εταιρείας DAKO: EnVision System –HRP για 30 λεπτά και τέλος ξανά πλύσιμο με TBS (3x5 λεπτά έκαστο).

Οι ανοσοαντιδράσεις οπτικοποιήθηκαν με την χρωστική τετρα-υδροχλωρική 3,3' διαμινοβενζιδίνη (3,3' diaminobenzidine-tetra-hydrochloride, DAB) κάτω από συνεχή έλεγχο του οπτικού μικροσκοπίου ώστε να επιτευχθεί η κατάλληλη ένταση του χρώματος.

Τέλος, οι τομές αντιχρώστηκαν με αιματοξυλίνη (2-3 εμβαπτίσεις σε διάλυμα αιματοξυλίνης Harris και 10-15 εμβαπτίσεις σε νερό βρύσης), αφυδατώθηκαν σε βαθμιδούμενα διαλύματα αλκοόλης και ξυλόλη και καλύφθηκαν με καλυπτρίδα. Το αποτέλεσμα εμφανίζει την παρουσία των Σταθμινών με χρώμα καφέ και τους πυρήνες των κυττάρων με χρώμα μπλε κάτω από οπτικό μικροσκόπιο.

5.6.2.2 Διπλή ανοσοϊστοχημεία φθορισμού

Οι τομές κρυοστάτη αφού βγήκαν από τον καταψύκτη -80°C αφέθηκαν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 1 ώρα και κατόπιν τοποθετήθηκαν για ενυδάτωση σε απεσταγμένο νερό για 5'. Ο αποκλεισμός των μη-ειδικών αντιγονικών θέσεων στον ιστό έγινε με επώαση με διάλυμα 10% βόειου εμβρυϊκού ορού (Fetal Bovine Serum, FBS) σε PBS για 30 λεπτά.

Τα πρώτα αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκαν καθώς επίσης και οι αραιώσεις τους ήταν οι ακόλουθες: stathmin1 (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100) /MAP2 (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος clone AP20, Millipore, διάλυση 1:500) SCG10 (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100) / MAP2 (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος clone AP20, Millipore, διάλυση 1:500), SCLIP (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100) /MAP2 (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος clone AP20, Millipore, διάλυση 1:500), SMI 31 (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος, Calbiochem, διάλυση 1:1000) /SCG10 (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100), SMI31 (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος, Calbiochem, διάλυση 1:1000) / SCLIP (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100), SMI32 (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος, Calbiochem, διάλυση 1:1000) / SCG10 (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100), SMI32 (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος, Calbiochem, διάλυση 1:1000) / SCLIP (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100), APP (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος, clone22c11, Chemicon 1:1000) / SCG10 (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100), APP (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος, clone22c11, Chemicon διάλυση 1:1000) / SCLIP (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100), GAP43 (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος, Sigma, διάλυση 1:500) / SCG10 (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100), GAP43 (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος, Sigma, διάλυση 1:500) / SCLIP (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100), Stathmin1 (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100) /NG2 (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος, Millipore, διάλυση 1:100), stathmin1 (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100) /O4 (μονοκλωνικό αντίσωμα μύος, Millipore, διάλυση 1:300), Stathmin1 (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου,

ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100)/CNPase (μονοκλωνικό αντίσωμα μυός, Millipore, διάλυση 1:300). Οι τομές επωάστηκαν ολονύκτια στους 4° C. Πραγματοποιήθηκε μία χρώση τριπλού ανοσοφθορισμού όπου τα πρώτα αντισώματα ήταν stathmin 1 (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100)/ NG2 (μονοκλωνικό αντίσωμα μυός, Millipore, διάλυση 1:100)/ MAC3 (μονοκλωνικό αντίσωμα επίμυος, BD Biosciences, διάλυση 1:500) and stathmin 1 (πολυκλωνικό αντίσωμα κονίκλου, ευγενική χορηγία Καθηγητή Sobel, INSERM, Paris, διάλυση 1:100)/ CNPase (μονοκλωνικό αντίσωμα μυός, Millipore, διάλυση 1:300)/ MAC 3(μονοκλωνικό αντίσωμα επίμυος, BD Biosciences, διάλυση 1:500).

Τέλος προστέθηκαν τα αντίστοιχα δεύτερα αντισώματα Goat anti-mouse IgG 555 (BiotiumCF 555) , goat anti-rabbit IgG (BiotiumCF 488A), goat anti-mouse IgM (Jackson ImmunoResearch) and chicken anti-rat 647(Alexa 647). Η χρώση ολοκληρώθηκε με πλύσεις σε TBS και κάλυψη των τομών με 1-2 σταγόνες DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Biotium) και καλυπτρίδα. Το παχύρευστο διάλυμα DAPI βάφει τους πυρήνες φθορίζοντες μπλε και ταυτόχρονα λειτουργεί ως προστατευτικό και καλυπτικό μέσο των τομών. Η θετικότητα των χρώσεων ελέγχθηκε κάτω από μικροσκόπιο φθορισμού.

5.7 Ιστοπαθολογική Εκτίμηση

Οι τομές μελετήθηκαν κάτω από οπτικό μικροσκόπιο και φθορισμό. Το μικροσκόπιο που χρησιμοποιήθηκε είναι το Zeiss AxioPlan-2 με τη βοήθεια της κάμερας CCD (Nikon DS-5Mc). Επίσης χρησιμοποιήθηκε και μικροσκόπιο συνεστίασης (Nikon Eclipse TE2000U). Έγινε μια πρώτη αρχική εκτίμηση της έκφρασης των Σταθμινών στη λευκή και φαιά ουσία σε όλα τα στάδια της ΠΑΕ σε σύγκριση με τα φυσιολογικά ζώα. Στη συνέχεια η ανάλυση επικεντρώθηκε μέσα στις φλεγμονώδεις περιοχές της λευκής ουσίας. Κατά μέσω όρο χρησιμοποιήθηκαν 15 οπτικά πεδία από κάθε ζώο και για κάθε ομάδα της ΠΑΕ. Η μεγέθυνση που χρησιμοποιήθηκε στο μικροσκόπιο ήταν 20X και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως θετικά κύτταρα ανά τετραγωνικό χιλιοστό (cells/mm²). Η μελέτη του ανοσοφθορισμού έγινε στο μικροσκόπιο φθορισμού και στο συν εστιακό μικροσκόπιο και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως περικυτταρικό μέγεθος ανά τετραγωνικά μικρά (pericaryal size μm²), ως ολοκληρωμένη πυκνότητα (Inegrated Density – In.Den), ως θετικά κύτταρα ανά τετραγωνικό χιλιοστό (cells /mm²) και ως επί τοις εκατό έκφραση

(%). Όλες οι φωτογραφίες των τομών και οι μετρήσεις έγιναν με τη βοήθεια ενός προγράμματος ImageJ 1.43u.

5.8 Στατιστική ανάλυση

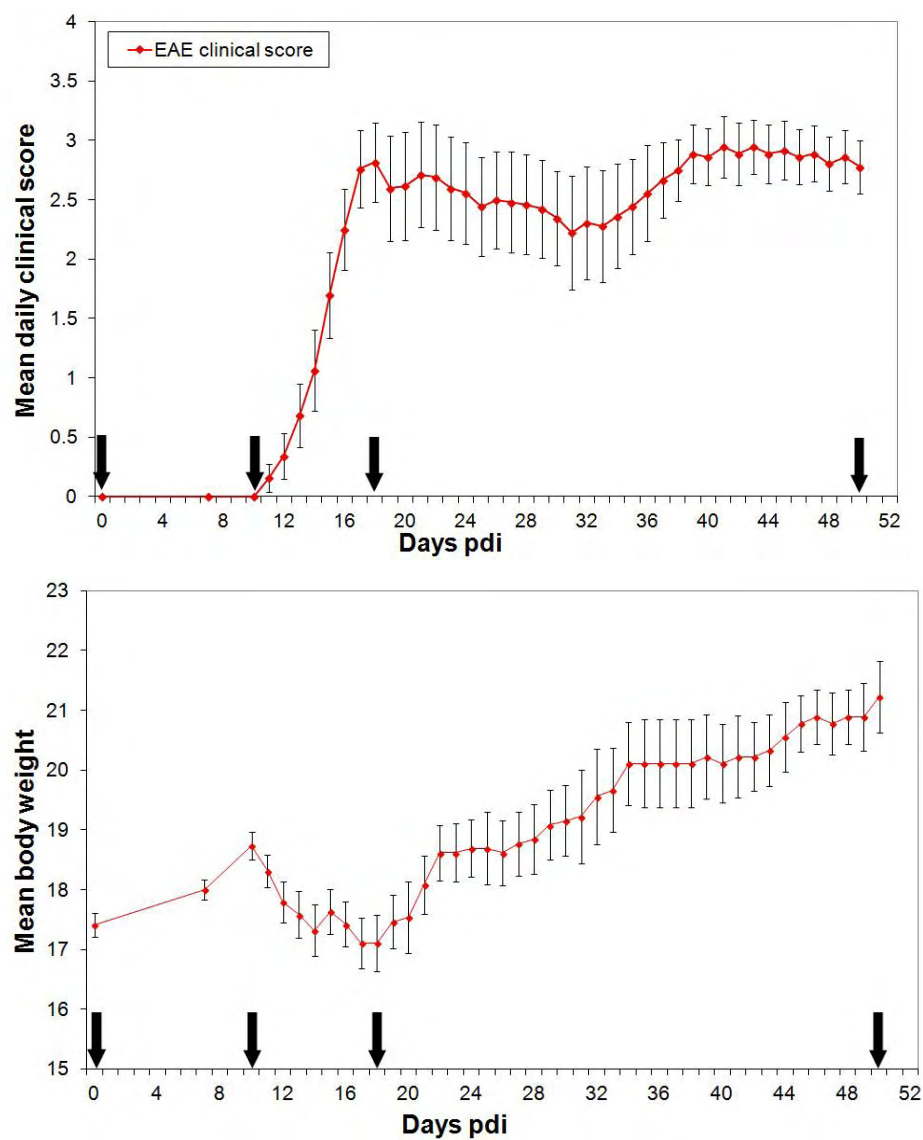
Η στατιστική ανάλυση όλων των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος GraphPad Prism 5.0. Η κανονικότητα των κατανομών ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τα τεστ Shapiro-Wilk and Kolmogorov-Smirnov. Οι παραμετρικές τιμές αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας ANOVA και ακολούθησε τεστ πολλαπλής σύγκρισης Bonferroni post-hoc. Μη παραμετρικές τιμές αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας Kruskal-Wallis και ακολούθησε τεστ πολλαπλής σύγκρισης Dunn's post-hoc. Οι τιμές όλες εκφράζονται ως μέσο όρο \pm τυπική απόκλιση. Όλοι οι προσδιορισμοί έγιναν με διάστημα εμπιστοσύνης 95% και θεωρήθηκαν σημαντικές σε επίπεδο $p < 0,05$.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

Αποτελέσματα

6.1 Κλινική εκτίμηση της ΠΑΕ.

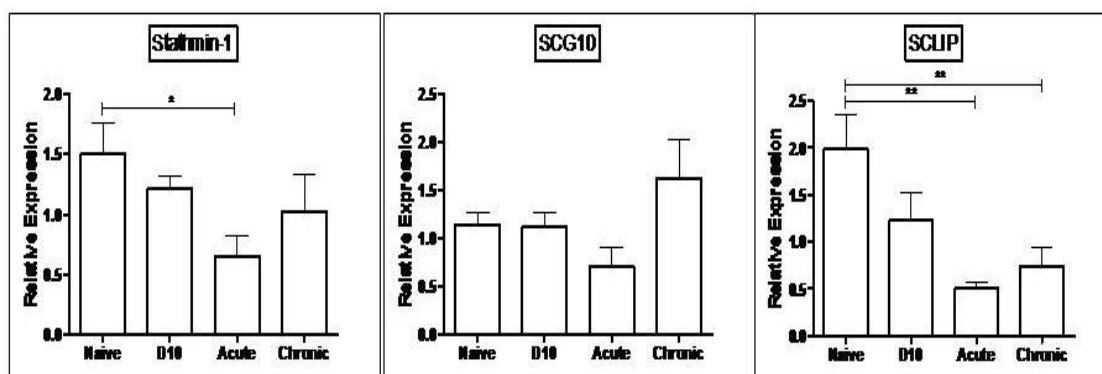
Τα πειραματόζωα ανέπτυξαν χρόνια ΠΑΕ με την εμφάνιση των συμπτωμάτων να ξεκινούν από τη 12^η ημέρα και να καταλήγει στη οξεία φάση την ημέρα 21 (D21) κατά προσέγγιση ακολούθησε ένα μικρό στάδιο μείωσης του κλινικού σκορ για να καταλήξει στη χρόνια φάση (D50) (**Εικόνα 3**). Υπολογίστηκαν οι μέσες μέγιστες βαθμολογίες (Mean Maximal Scores-MMS) προσθέτοντας τα σκορ των μεμονωμένων πειραματόζωων και διαιρώντας με τον αριθμό των πειραματόζωων σε κάθε ομάδα, συμπεριλαμβάνουν επίσης και αυτά των πειραματόζωων που δεν αναπτύσσουν σημεία της ΠΑΕ, το σκόρ ήταν 4.0 ± 0.2 και αποτελεί μέτρο ένδειξης της βαρύτητας της νόσου. Υπολογίστηκε και ο μέσος όρος της ημέρας έναρξης της ΠΑΕ (day of Disease onset ,dDo) προσθέτοντας την πρώτη ημέρα του κλινικού εμφάνισης του κάθε πειραματόζωου και διαιρώντας με τον αριθμό των πειραματόζωων στην ομάδα, το σκόρ ήταν 16.6 ± 1.6 . Υπολογίστηκε και η περιοχή κάτω από την καμπύλη (area under the curve AUC) ήταν 102.6 ± 13.3 , η οποία αναφέρεται σε μια γραφική παράσταση των κλινικών βαθμολογιών κατά τη διάρκεια της μελέτης, η οποία αντιστοιχεί σε περιοχή μεταξύ της κλινικής γραμμής χάραξης και του άξονα x, η οποία αντιπροσωπεύει συνήθως το χρόνο και μετράτε σε ημέρες, δίνει πληροφορίες για την έκταση της νόσου και υπολογίζεται με έναν ειδικό μαθηματικό τύπο [52]. Παράλληλα με τα κλινικά σκορ παρακολούθηθηκε και η απώλεια βάρους των πειραματόζωων, όπου σημειώθηκε πτώση του βάρους από την ημέρα 11 ως τη μέρα 18 ενώ σταδιακά προς τη χρόνια φάση το βάρος τους άρχισε να είναι ανοδικό .



Εικόνα 3: Καταγραφή και διακυμάνσεις του κλινικού σκορ και των βαρών των πειραματόζων μέχρι την ημέρα θυσίας ως στη χρόνια φάση της ΠΑΕ. Τα βέλη υποδεικνύουν τις ημέρες της θυσίας φυσιολογικά (ημέρα 0, D0), ενδιάμεση προκλινική φάση (ημέρα 10, D10), οξεία φάση (ημέρα 18, D18) και χρόνια φάση (ημέρα 50, D50).

6.2 mRNA έκφραση των Σταθμινών

Η σχετική έκφραση της Σταθμίνης 1 στο νωτιαίο μυελό μειώθηκε στη οξεία φάση συγκρινόμενη με την ομάδα των φυσιολογικών ($p<0.05$). Η Σταθμίνη 3 επίσης εμφάνισε μοτίβο παρόμοιο της Σταθμίνης 1 δηλαδή πτώση της έκφρασης στη οξεία και στη χρόνια φάση συγκρινόμενη με την ομάδα των φυσιολογικών ($p<0.01$). Η Σταθμίνη 2 δεν παρουσίασε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά ανάμεσα στις ομάδες. (Εικόνα 4)



Εικόνα 4: Αποτελέσματα της RT-PCR, σχετική έκφραση των Σταθμινών 1 , 2 και στο νωτιαίο μυελό (λευκή και φαιά ουσία) στη μοντέλο της ΠΑΕ

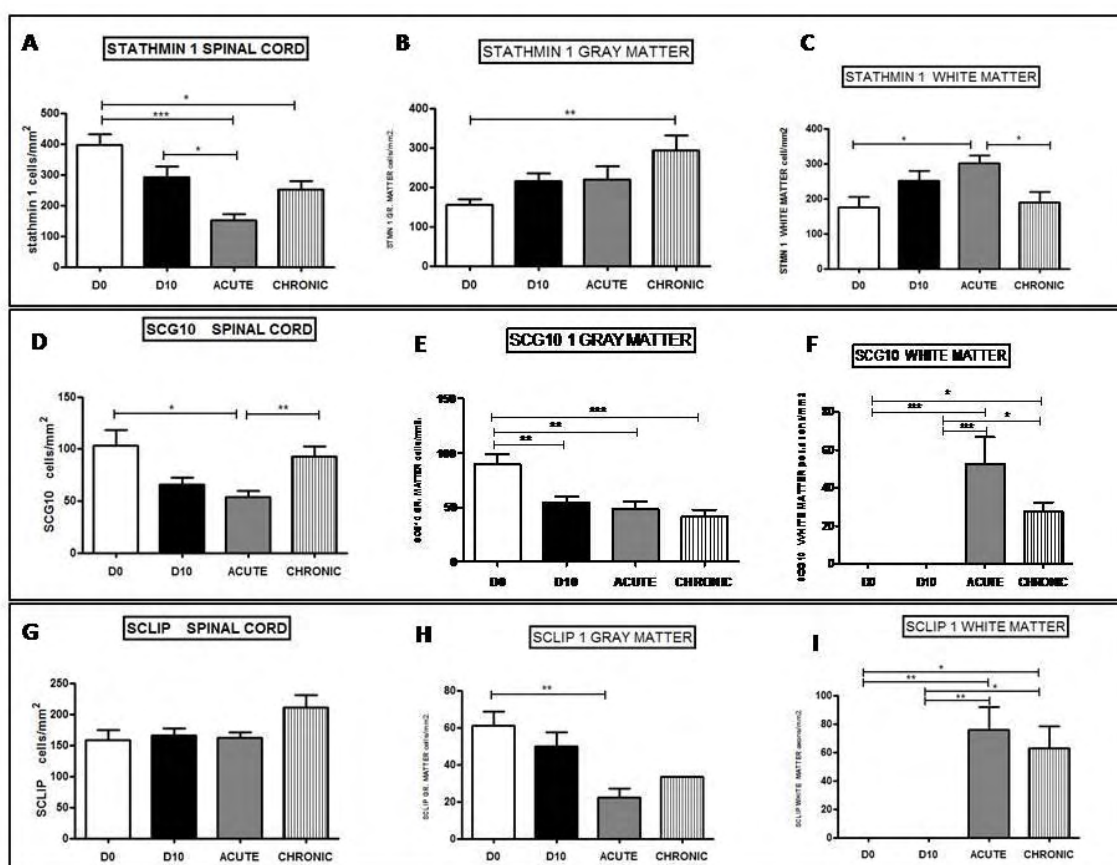
6.3 Πρωτεϊνική έκφραση των Σταθμινών στο νωτιαίο μυελό

Η μελέτη των Σταθμινών στη φαιά και λευκή ουσία στο νωτιαίο μυελό αποκάλυψε σημαντική μείωση στην οξεία φάση (152.1 ± 88.76 , $p<0.001$) και μικρή αύξηση στη χρόνια φάση (250.6 ± 132.5 , $p<0.05$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά (396.7 ± 161.4). Στη συνέχεια έγινε υποανάλυση της φαιάς και λευκής ουσίας ώστε να υπάρχουν ξεχωριστές μετρήσεις, οι οποίες αποκάλυψαν ένα διαφορετικό μοτίβο. Συγκεκριμένα στη φαιά ουσία παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση στη χρόνια φάση (293.1 ± 159.3 , $p<0.01$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά. Ενώ στη λευκή ουσία παρουσία φλεγμονής αποκαλύφθηκε αυξημένη έκφραση (300.8 ± 100.1 , $p<0.05$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά (174.8 ± 140.5) (Εικόνα 5a,5b).

Οι μετρήσεις της Σταθμίνης 2 στο νωτιαίο μυελό αποκάλυψαν παρόμοιο μοτίβο με τη Σταθμίνη 1, υπήρξε μείωση στην οξεία φάση (54.11 ± 23.73 , $p<0.05$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά (103.1 ± 61.65) και αύξηση στη χρόνια φάση (93.07 ± 42.02) μόνο συγκρινόμενα με

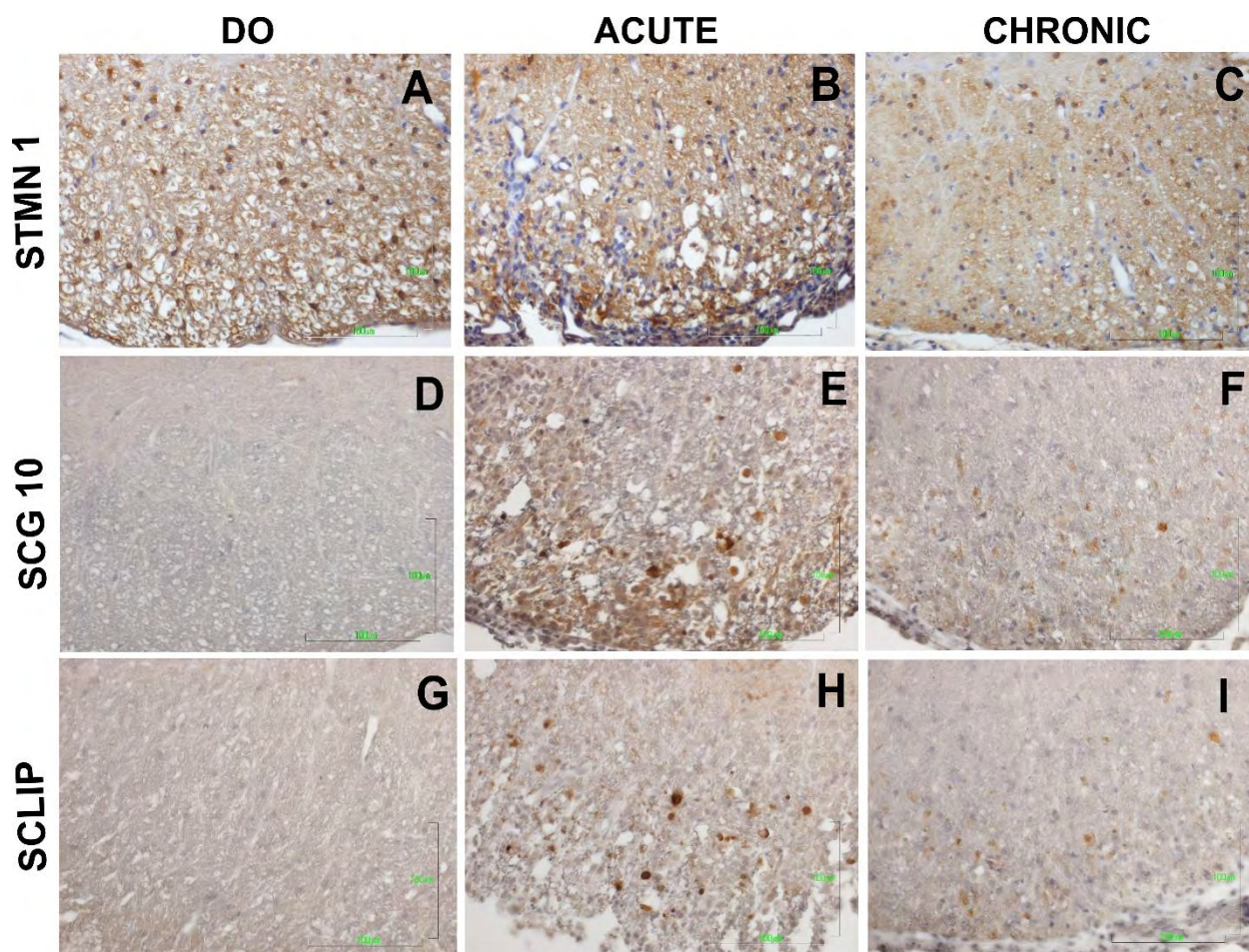
την οξεία φάση ($p<0.01$). Περαιτέρω ανάλυση στη φαιά ουσία έδειξε μείωση της έκφρασης της Σταθμίνης 2 σε όλα τις ομάδες από τη μέρα 10 (54.39 ± 18.46 , $p<0.01$), την οξεία φάση (48.57 ± 20.50 , $p<0.01$) ενώ η μείωση συνεχίστηκε και στη χρόνια φάση (41.07 ± 20.96 , $p<0.001$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά (89.92 ± 29.81). Χαρακτηριστικό ήταν στη συνέχεια ότι στη λευκή ουσία δεν υπήρχε παρουσία της Σταθμίνης 2 στη φυσιολογική ομάδα και στην ομάδα της ημέρας 10 ενώ αντίθετα μέσα στη φλεγμονή υπήρξε παρουσία τους στην οξεία φάση (52.73 ± 39.25 , $p<0.001$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά και μια μικρή αύξηση στη χρόνια φάση (27.75 ± 13.27 , $p<0.05$) (Εικόνα 5a,5b).

Μετρήσεις για την Σταθμίνη 3 σε όλες τις περιοχές του νωτιαίου μυελού δεν αποκάλυψε καμία διαφορά ανάμεσα σε όλες τις ομάδες. Περαιτέρω ανάλυση αποκάλυψε διαφορές μόνο στη φαιά ουσία στην οξεία φάση (22.20 ± 12.16 , $p<0.01$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά (61.05 ± 18.24). Στη λευκή ουσία η Σταθμίνη 3 ακολουθεί παρόμοιο μοτίβο με την Σταθμίνη 2, αυξημένη έκφραση στην οξεία φάση (75.86 ± 39.35 , $p<0.01$) και στη χρόνια φάση (62.90 ± 37.59 , $p<0.05$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά (Εικόνα 5a,5b).



Εικόνα 5a: Στατιστικά γραφήματα από μετρήσεις ανοσοιστοχημείας Σταθμίνης 1, Σταθμίνης 2 (D) και της Σταθμίνης 3 (G) στο νωτιαίο μυελό και αποτελέσματα από τις μετρήσεις ξεχωριστά

για την φαιά (B, E, H,) και τη λευκή ουσία (C,F,I) στο μοντέλο της ΠΑΕ σε όλες τις χρονικές στιγμές .



Εικόνα 5b: Ανοσοιστοχημικές αντιδράσεις (DAB) και φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο αποκαλύπτουν την παρουσία της Σταθμίνης 1 (STMN 1-A, B, C), της Σταθμίνης 2 (SCG 10-D, E, F) και της Σταθμίνης 3 (SCLIP-G, H, I) στη φυσιολογική ομάδα ,στην ομάδα της οξείας και χρόνιας φάσης όπου παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές

6.4 Μελέτη της έκφρασης των ολιγοδενροκυττάρων στις χρονικές στιγμές της ΠΑΕ και η συνέκφραση τους με την Σταθμίνη 1 στη λευκή ουσία.

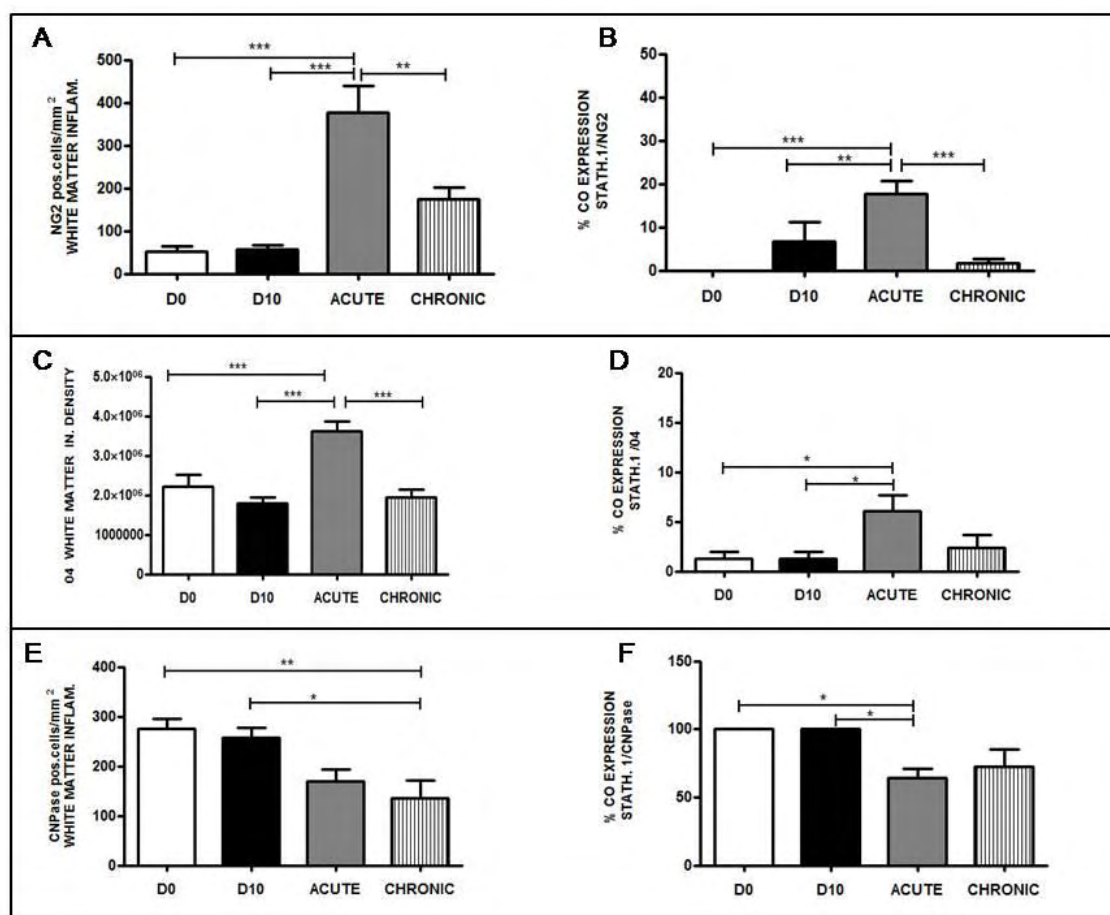
Μελετήθηκε η παρουσία των ολιγοδενροκυττάρων στη λευκή ουσία παρουσία της φλεγμονής. Οι μετρήσεις έδειξαν μικρό αριθμό NG2 (Chondroitin Sulfate Proteoglycan) θετικών κυττάρων στην ομάδα των φυσιολογικών και στην ομάδα της προκλινικής φάσης –ημέρα 10 ενώ υπήρξε αύξηση στη οξεία φάση (377.4 ± 194.8) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά (51.06 ± 39.23) και την ημέρα 10 (55.50 ± 36.63) ($p < 0.001$). Στη χρόνια φάση παρατηρήθηκε μείωση συγκρινόμενα με την οξεία φάση (174.3 ± 89.12 , $p < 0.001$). Παρόμοιο μοτίβο ακολουθούν και τα κύτταρα τα οποία ήταν O4 (στάδιο ωρίμανσης ολιγοδενροκυττάρων) θετικά, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση στην οξεία φάση ($1.3622e+006 \pm 792698$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά ($2.205e+006 \pm 910679$) και την ημέρα 10 ($1.799e+006 \pm 455104$) ($p < 0.001$) και μειωμένη έκφραση στη χρόνια φάση ($1.951e+006 \pm 642613$) συγκρινόμενα με την οξεία φάση ($p < 0.01$). Διαφορετικό μοτίβο ακολουθήσαν τα κύτταρα τα οποία ήταν CNPase (2',3'-Cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase) θετικά. Συγκεκριμένα υπήρξε η τάση για μείωση στην οξεία φάση αλλά στατιστικά σημαντικά ήταν μόνο στην χρόνια φάση (135.4 ± 113.3) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά (275.3 ± 64.90) την ημέρα 10 (257.5 ± 61.21), ($p < 0.01$) και ($p < 0.05$) αντίστοιχα (**Εικόνα 6a**).

Στην προσπάθεια να αποκαλυφθεί η τυχόν συνέκφραση της Σταθμίνης 1 με τα κύτταρα που εξέφραζαν NG2, O4 και CNPase πραγματοποιήθηκαν διπλές χρώσεις ανοσοφθορισμού. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι δεν υπήρξε καθόλου συνέκφραση της Σταθμίνης 1 με τα NG2 θετικά κύτταρα στην ομάδα των φυσιολογικών αλλά παρατηρήθηκε μια μικρή αύξηση της συνέκφρασης από την ημέρα 10 ωστόσο χωρίς στατιστικές διαφορές. Μεγαλύτερα ποσοστά συνέκφρασης αποκαλύφθηκαν στη οξεία ($17.55 \pm 13.55\%$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά (0%) και την ημέρα 10 ($6.667 \pm 20.52\%$), ($p < 0.001$) and ($p < 0.01$) αντίστοιχα. Στη χρόνια φάση τα επίπεδα της συνέκφρασης ήταν μόνο $1.76 \pm 4.40\%$ και με στατιστική διαφορά συγκρινόμενη με τη οξεία φάση ($p < 0.001$).

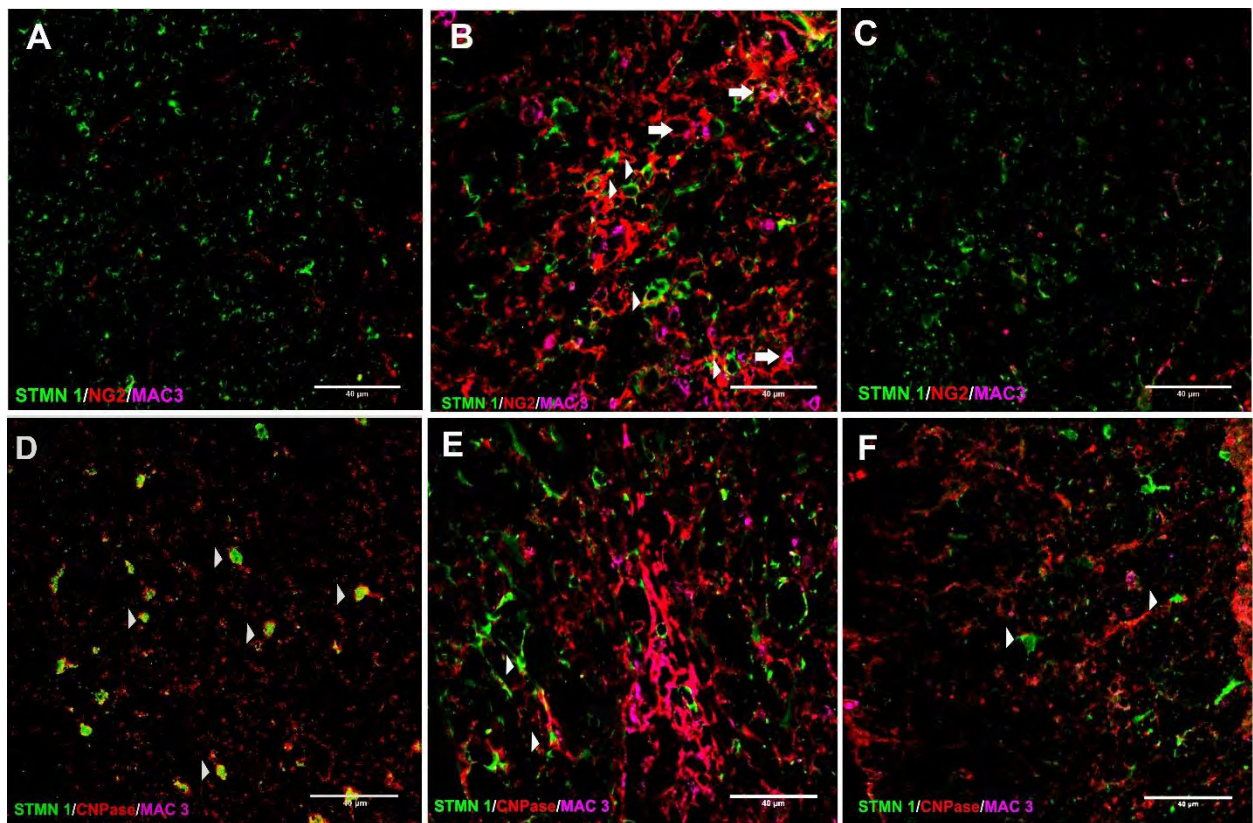
Στη συνέχεια ο ανοσοφθορισμός αποκάλυψε χαμηλά επίπεδα συνέκφρασης στα φυσιολογικά και στη φάση –ημέρα 10 ($1.25 \pm 3.38\%$ and $1.24 \pm 3.56\%$ αντίστοιχα). Στην οξεία φάση τα επίπεδα ήταν υψηλότερα ($6.11 \pm 7.89\%$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά ($p < 0.05$). Στη χρόνια φάση η συνέκφραση ήταν μειωμένη χωρίς στατιστική διαφορά ($2.38 \pm 5.98\%$).

Επιπλέον, η συνέκφραση της Σταθμίνης 1 και CNPase ήταν 100% στα φυσιολογικά και στην προκλινική φάση –ημέρα 10 ενώ παρουσίασε μείωση στην οξεία φάση ($64.41 \pm 15.81\%$). Στη χρόνια φάση παρατηρήθηκε μικρή αύξηση χωρίς όμως στατιστική διαφορά (**Εικόνα 6a**).

Η **εικόνα 6b** υποδεικνύει την απουσία συνέκφρασης της Σταθμίνης 1/NG2 (A) ενώ υπάρχει καθολική συνέκφραση της Σταθμίνης 1/CNPase (D) στη φυσιολογική ομάδα. Στην οξεία φάση υπήρξε αύξηση της συνέκφρασης Σταθμίνης 1/NG2 (B) και μείωση της συνέκφρασης Σταθμίνης 1/CNPase (E) μέσα στη φλεγμονή της λευκής ουσίας. Ο μακροφαγικός δείκτης, MAC3, δείχνει και ένα ποσοστό των NG2 θετικών κυττάρων να είναι επίσης και MAC3 θετικά. Στη χρόνια φάση η συνέκφραση της Σταθμίνης 1/NG2 (C) ήταν μειωμένη και παρόμοια ήταν και η συνέκφραση της Σταθμίνης 1/CNPase (F).



Εικόνα 6a : Γραφήματα από τις μετρήσεις για την παρουσία των NG2, O4 και CNPase στη λευκή ουσία (A,C,E) και γραφήματα που αποκαλύπτουν τα ποσοστά συνέκφρασης τους με τη Σταθμίνη 1 (B,D,F).

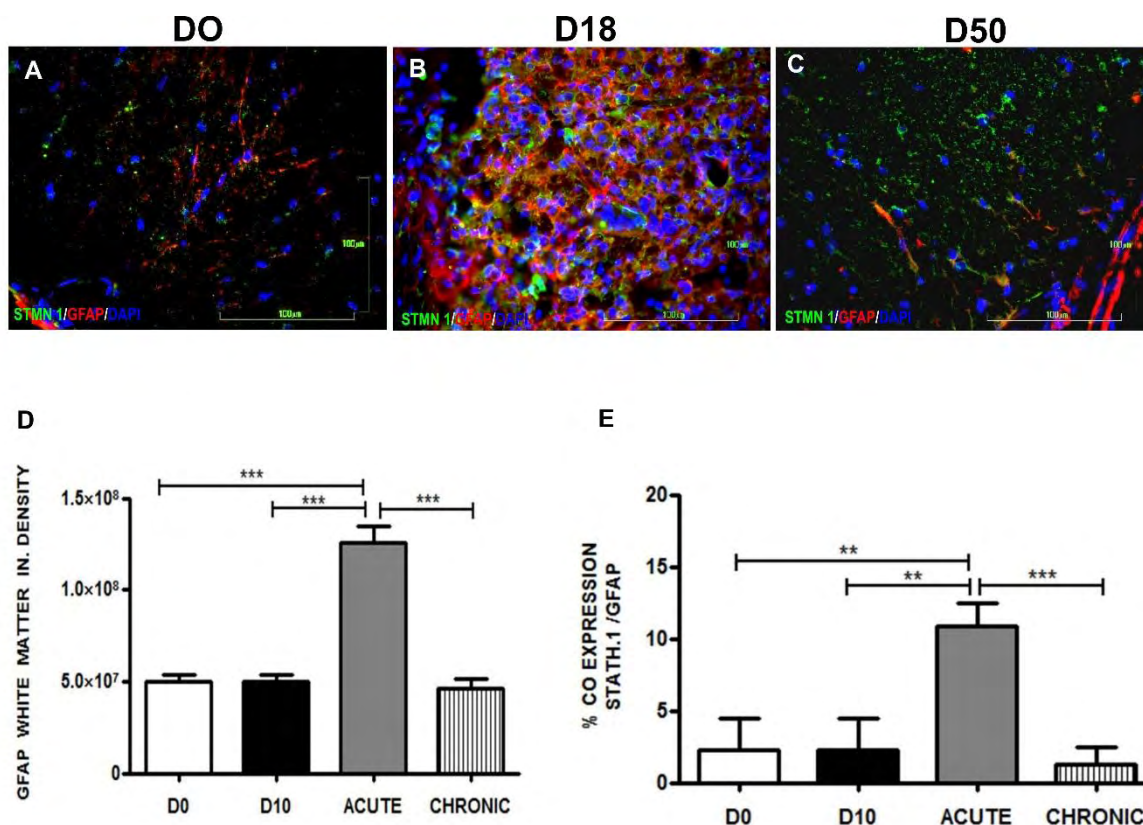


Εικόνα 6b: Φωτογραφίες από συνεστιακό μικροσκόπιο και τριπλό ανοσοφθορισμό Σταθμίνη 1(πρασινό)/NG2(κόκκινο)/MAC 3(μωβ). Στα φυσιολογικά υπήρξε έκφραση μόνο της Σταθμίνης 1 ενώ στην οξεία φάση υπήρξε αύξηση της συνέκφρασης NG2 και Σταθμίνης 1 (κεφαλή βελών ,B) και απουσία συνέκφρασης με τα MAC3 θετικά κύτταρα(βέλη ,B). Στη χρόνια φάση τα επίπεδα της συνέκφρασης ήταν χαμηλά (C). Τριπλός ανοσοφθορισμός ανάμεσα στη Σταθμίνη 1(πράσινο)/CNPase(κόκκινο)/MAC 3(μώβ) έδειξε 100% συνέκφραση του CNPase με τη Σταθμίνη 1 στη φυσιολογική ομάδα (βέλη, D) και μείωση στην οξεία φάση (βέλη, E) αλλά υποδεικνύει και την παρουσία των MAC 3 μέσα στη φλεγμονή της λευκής ουσίας (E).Στη χρόνια φάση η συνέκφραση παρέμεινε στα ίδια επίπεδα με την οξεία φάση (βέλη ,F).

6.5 Μελέτης της έκφρασης των αστροκυττάρων στις χρονικές στιγμές της ΠΑΕ και η συνέκφραση τους με την Σταθμίνη 1 στη λευκή ουσία.

Μετρήσεις της Νευρογλοιακής Ινδικής Όξινης Πρωτεΐνης (Glial fibrillary acidic protein -GFAP) απόκαλυψαν ότι τα επίπεδα της «ολοκληρωμένης πυκνότητας»(Integrated Density-In.Den) στη φυσιολογική ομάδα και στην προκλινική φάση –ημέρα 10 ήταν παρόμοια, ωστόσο τα επίπεδα στην οξεία φάση ήταν αυξημένα ($1.258e+008 \pm 2.888e+007$) συγκρινόμενα με τη φυσιολογική ομάδα και στην ημέρα 10 ($5.027e+007 \pm 1.219e+007$) και ($5.012e+007 \pm 1.292e+007$) με στατιστική σημαντική διαφορά $p < 0.001$. Στη χρόνια φάση τα επίπεδα της GFAP επέστρεψαν στα

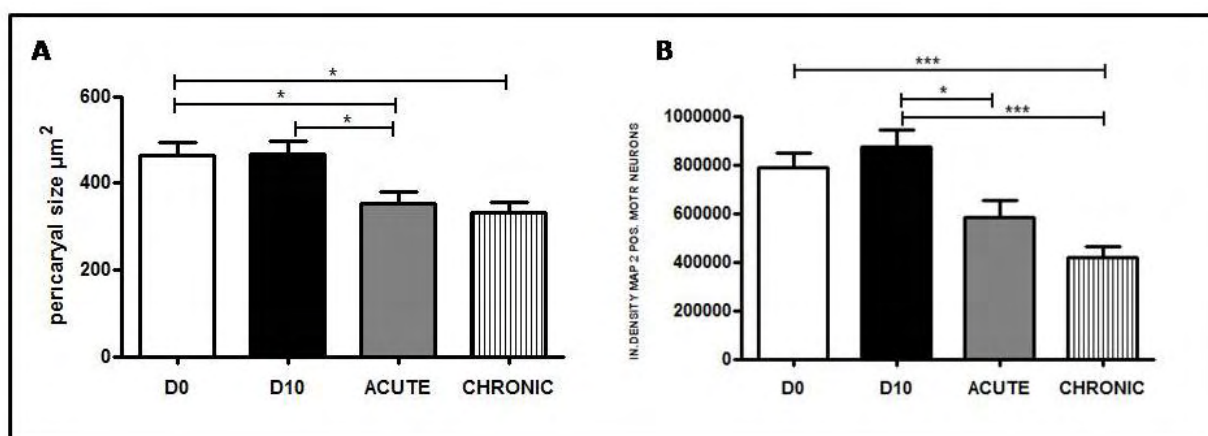
αρχικά σε σχέση με τα φυσιολογικά και τη φάση –ημέρα 10 αλλά συγκρινόμενα με τη οξεία φάση υπήρχε στατιστική διαφορά (**Εικόνα 7 D**). Περαιτέρω μετρήσεις αποκάλυψαν αυξημένη συνέκφραση της Σταθμίνης 1/GFAP στη οξεία φάση ($10.87 \pm 5.20\%$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά ($2.22 \pm 6.67\%$) και τη φάση –ημέρα 10 ($2.11 \pm 6.33\%$), $p < 0.01$ αντίστοιχα. Στη χρόνια φάση παρατηρήθηκε μείωση μόνο σε σχέση με την οξεία φάση ($1.25 \pm 3.95\%$, $p < 0.001$) (**Εικόνα 7E**).



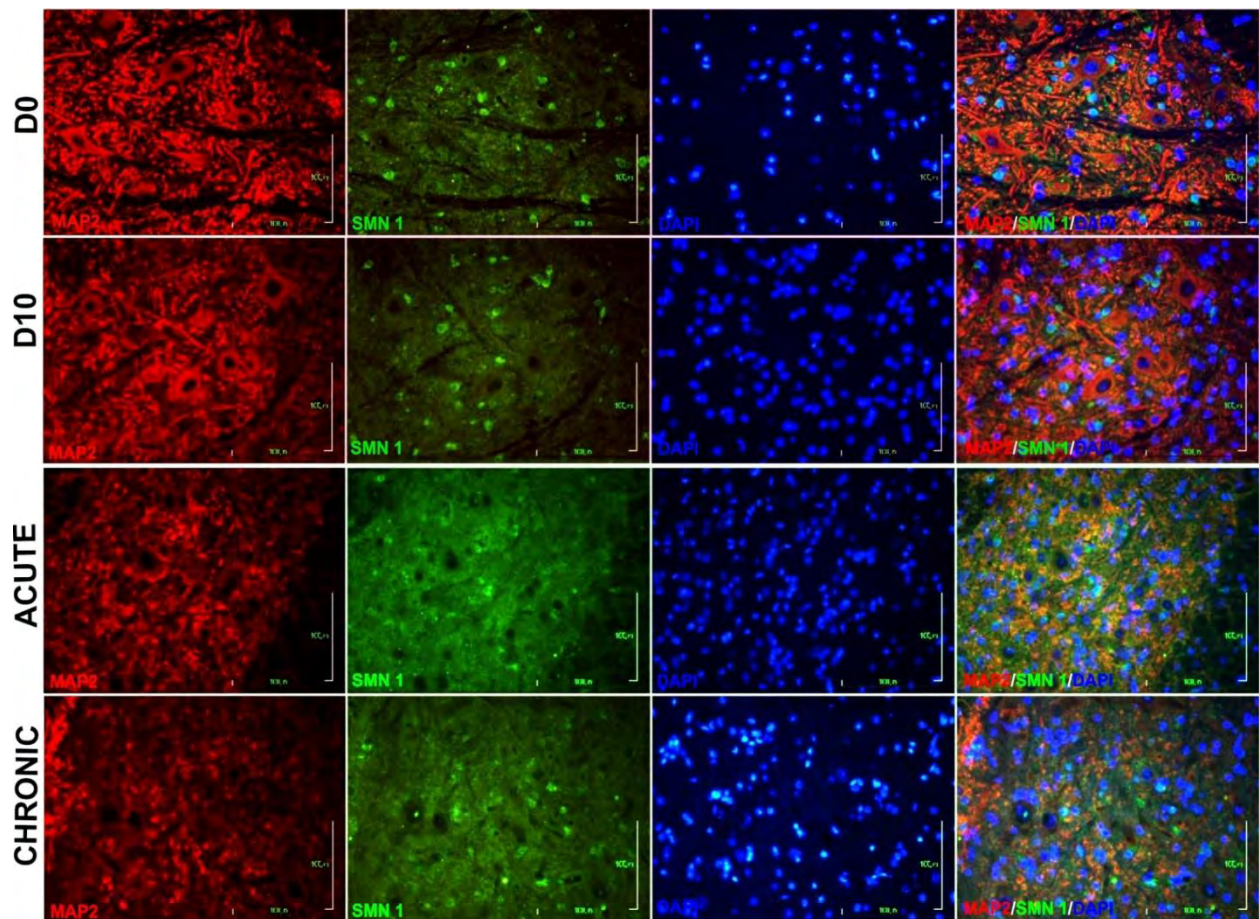
Εικόνα 7 : Διπλός ανοσφθορισμός της Σταθμίνης 1 (πράσινο)/GFAP (κόκκινο) δείχνουν τα επίπεδα της συνέκφρασης στη φυσιολογική ομάδα (D0) ,στην οξεία (D18) και χρόνια φάση (D50). Φωτογραφίες από οπτικό μικροσκόπιο, κλίμακα 100μm. Το μπλε χρώμα δείχνει την παρουσία πυρήνων. (A,B,C). Αποτελέσματα από μετρήσεις ολοκληρωμένης πυκνότητας της GFAP μέσα στη φλεγμονής (D) και επί της εκατό συνέκφραση Σταθμίνης 1/GFAP (E).

6.6.Μελέτη των νευρώνων στις χρονικές φάσεις της ΠΑΕ και η συνέκφραση με τη Σταθμίνη 2 και Σταθμίνη 3.

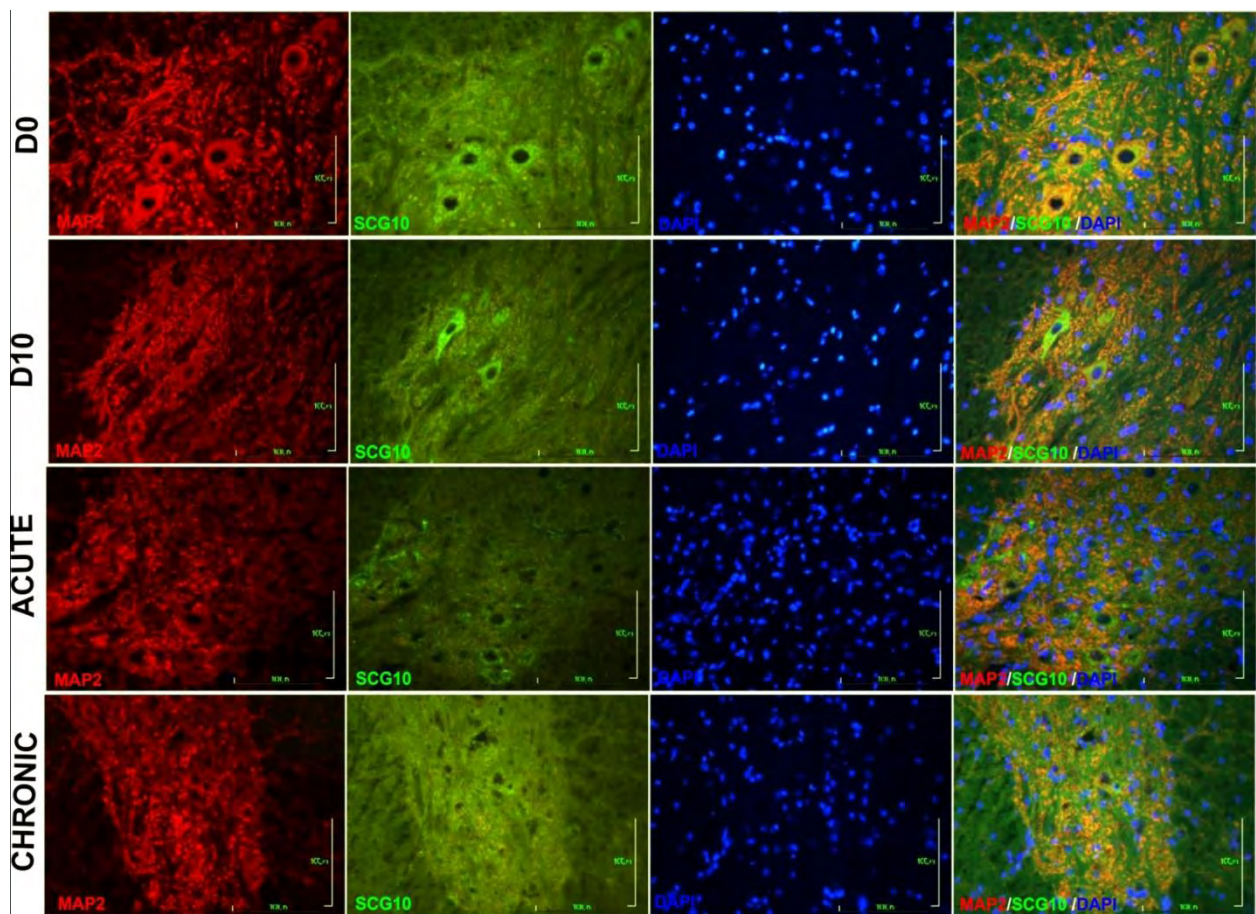
Μετρήσεις της Συνδεδεμένης με τους μικροσωληνίσκους-πρωτεΐνη (Microtubule-associated protein -MAP) στη φαιά ουσία έγιναν για να εκτιμηθεί η κατάσταση των σωμάτων των νευρώνων και των δενδριτών αλλά και αν η MAP 2 συνεκφράζεται με κάποιες από τις Σταθμίνες. Οι μετρήσεις αποκάλυψαν ότι υπήρξε μείωση έκφραση του MAP 2 σε ότι αφορά το μέγεθος του περικάρυου (μm^2) στην οξεία φάση (351.9 ± 138.9) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά (464.2 ± 166.1) και την ημέρα 10 (466.9 ± 172.3), $p < 0.05$. Μετρήσεις της ολοκληρωμένης πυκνότητας αποκάλυψαν μειωμένη έκφραση της MAP 2 (584950 ± 348792) συγκρινόμενα με την προκλινική φάση –ημέρα 10 (872528 ± 384338 , $p < 0.05$). Επίσης παρατηρήθηκαν διαφορές ανάμεσα στη χρόνια φάση (418933 ± 219667) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά (785934 ± 326716) και τη φάση –ημέρα 10 ($p < 0.001$)(**Εικόνα 8a**). Διπλός ανοσοφθορισμός αποκάλυψε ότι δεν υπάρχει συνέκφραση της Σταθμίνης 1 με τη MAP 2)(**Εικόνα 8b**) ενώ αντίθετα υπάρχει συνέκφραση με τη Σταθμίνη 2 σε όλες τις ομάδες μόνο που στην οξεία και στη χρόνια φάση οι κινητικοί νευρώνες και οι δενδρίτες φαίνονται περισσότερο διαταραγμένοι (**Εικόνα 8c**). Το ίδιο ακριβώς μοτίβο ακολουθεί και η Σταθμίνη 3 σε συνάρτηση με τη συνέκφραση της με το MAP 2.



Εικόνα 8a: Γραφήματα μετρήσεων αποκαλύπτουν διακυμάνσεις του μεγέθους του περικάρυου στα στάδια της ΠΑΕ (A) και (B) μετρήσεις ολοκληρωμένης πυκνότητας των MAP 2 θετικών νευρώνων



Εικόνα 8b: Διπλός ανοσοφθορισμός της MAP 2 (κόκκινο) και της Σταθμίνης 1 (πράσινο) στη φαία ουσία που δείχνει την απουσία συνέκφρασης σε όλες τις φάσεις της ΠΑΕ. Οι φωτογραφίες είναι από μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού, κλίμακα επί 100 μm . Η χρώση Dapi (μπλέ) δείχνει την παρουσία των πυρήνων των κυττάρων



Εικόνα 8c: Διπλός ανοσοφθορισμός της MAP 2 (κόκκινο) και της Σταθμίνης 2 (SCG10-πράσινο) στη φαιά ουσία δείχνει την παρουσία συνέκφρασης σε όλες τις φάσεις της ΠΑΕ. Οι φωτογραφίες είναι από μικροσκόπιο ανοσοφθορισμού, κλίμακα επί 100 μm . Η χρώση Dapi (μπλέ) δείχνει την παρουσία των πυρήνων των κυττάρων.

6.7 Αξονική μελέτη στις χρονικές φάσεις της ΠΑΕ και η συνέκφραση με τις Σταθμίνη 2 και Σταθμίνη 3.

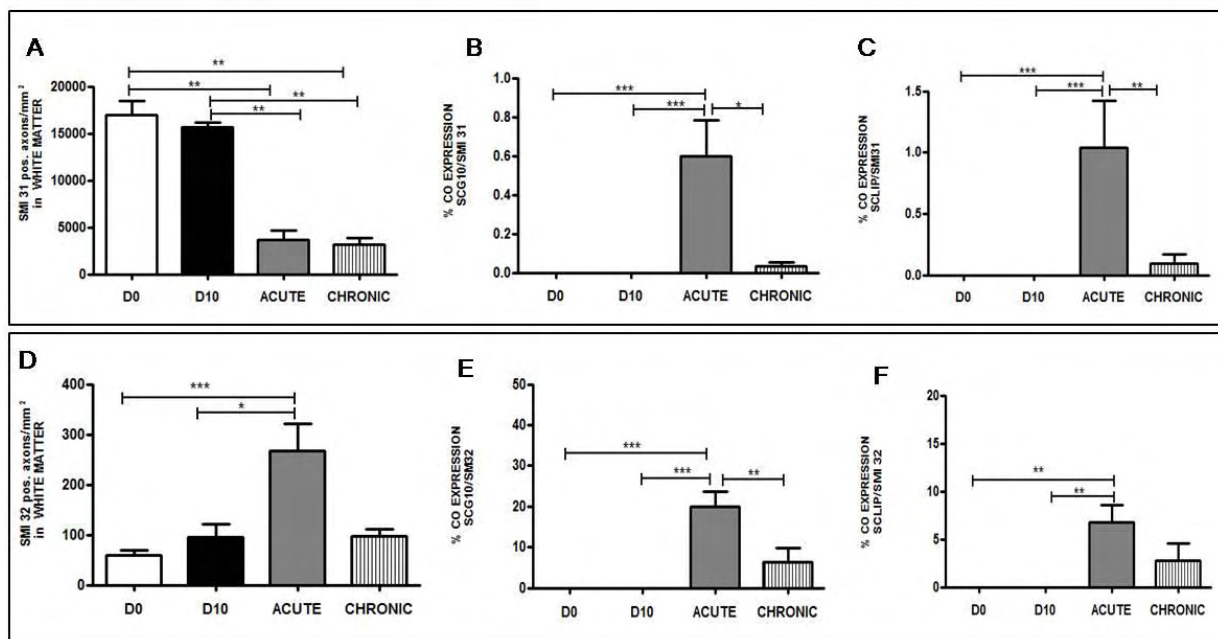
Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ώστε να καθοριστεί ο αριθμός των θετικών αξόνων που εκφράζουν τη φωσφορυλυωμένη μορφή της πρωτεΐνης των νευροινιδίων SMI 31 (εκφράζεται σε φυσιολογικούς άξονες) και τη μη- φωσφορυλυωμένη μορφή της πρωτεΐνης των νευροινιδίων SMI 32 (εκφράζεται σε μη φυσιολογικούς άξονες) και τα ποσοστά συνέκφρασης τους με την Σταθμίνη 2 και Σταθμίνη 3. Τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν αυξημένη έκφραση της SMI 31 στα φυσιολογικά (16931 ± 4701) και στη προκλινική φάση –ημέρα 10 (15699 ± 1406) ενώ παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των θετικών αξόνων στη οξεία φάση (3685 ± 2724 , $p < 0.01$) και στη χρόνια φάση (3156 ± 1906 , $p < 0.01$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά και την ημέρα 10. Περαιτέρω μετρήσεις για την επί τοις εκατό % συνέκφραση της SMI 31 με την Σταθμίνη 2

αποκάλυψαν αυξημένα επίπεδα στην οξεία φάση ($0.60 \pm 0.75\%$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά και την ημέρα 10 (0% , $p < 0.001$) και μείωση στη χρόνια φάση ($0.03 \pm 0.08\%$) συγκρινόμενα με την οξεία φάση ($p < 0.05$).

Παρόμοιο μοτίβο ακολουθεί και η Σταθμίνη 3 σε σχέση με ότι αφορά τη συνέκφραση της με την SMI 31, δηλαδή αύξηση της συν έκφρασης στην οξεία φάση ($1.04 \pm 1.27\%$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά και την ημέρα 10 (0% , $p < 0.001$) και μείωση στη χρόνια φάση ($0.95 \pm 0.23\%$) συγκρινόμενα με την οξεία φάση ($p < 0.01$) **(Εικόνα 9a A,B,C)**.

Επίσης μετρήσεις της SMI 32 έδειξαν αυξημένη έκφραση στην οξεία φάση (266.5 ± 215.9) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά και την ημέρα 10 (59.31 ± 40.49 , $p < 0.001$, 96.10 ± 96.96 , $p < 0.05$ αντίστοιχα). Η επί τοις εκατό % συνέκφραση τους ήταν αυξημένη στη οξεία φάση ($20.09 \pm 11.17\%$) συγκρινόμενη με τα φυσιολογικά και την ημέρα 10 (0% , $p < 0.001$) και μειωμένη στη χρόνια φάση ($6.27 \pm 11.17\%$, $p < 0.01$). Αύξηση της συν έκφρασης της Σταθμίνης 3 και της SMI 32 στην οξεία φάση ($6.73 \pm 5.46\%$) συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά και τη φάση ημέρα 10 (0% , $p < 0.01$) **(Εικόνα 9a D, E, F)**. Φωτογραφίες συνεστιακού μικροσκοπίου της SMI32(κόκκινο) και Σταθμίνη 2 αποδεικνύουν την αυξημένη συνέκφραση στην οξεία φάση και μείωση της συνέκφρασης στη χρόνια φάση) **(Εικόνα 9b)**

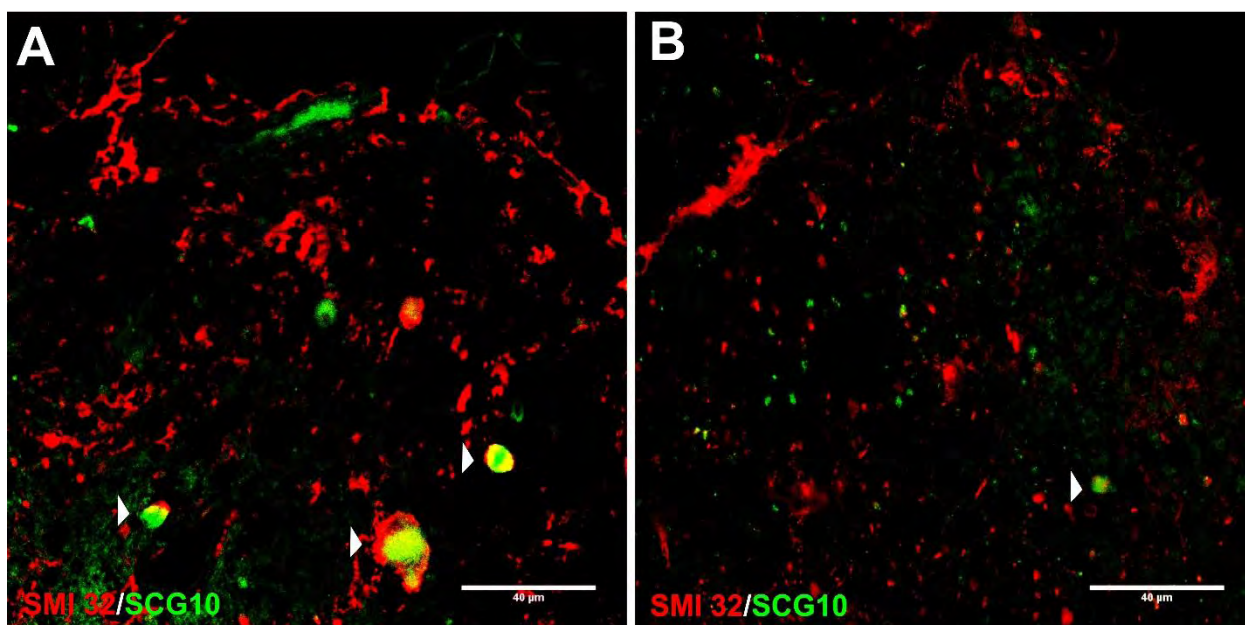
Τέλος μελετήθηκε και η συσχέτιση της Πρωτεΐνης Προδρόμου Αμυλοειδούς (Amyloid precursor protein, APP) και της αυξητικής Πρωτεΐνης 43 (Growth Associated Protein 43-GAP43) με τη Σταθμίνη 2 και τη Σταθμίνη 3 χρησιμοποιώντας διπλό ανοσοφθορισμό. Η συνέκφραση της APP/Σταθμίνης 2 ήταν αυξημένη στη οξεία φάση ($22.36 \pm 19.87\%$) συγκρινόμενη με την συνέκφραση της GAP 43/Σταθμίνης 2 (10.83 ± 12.12 , $p < 0.05$). Παράλληλα η συνέκφραση της APP/Σταθμίνης 3 στην οξεία φάση ήταν μειωμένη (10.71 ± 18.90) συγκρινόμενη με την συνέκφραση της GAP 43/Σταθμίνης 3 ($36.67 \pm 24.86\%$, $p < 0.05$) **(Εικόνα 10 E)**. Φωτογραφίες από συνεστιακό μικροσκόπιο δείχνουν αυτές τις διαφορές στην οξεία φάση της ΠΑΕ. **(Εικόνα 10 A,B,C,D)**.



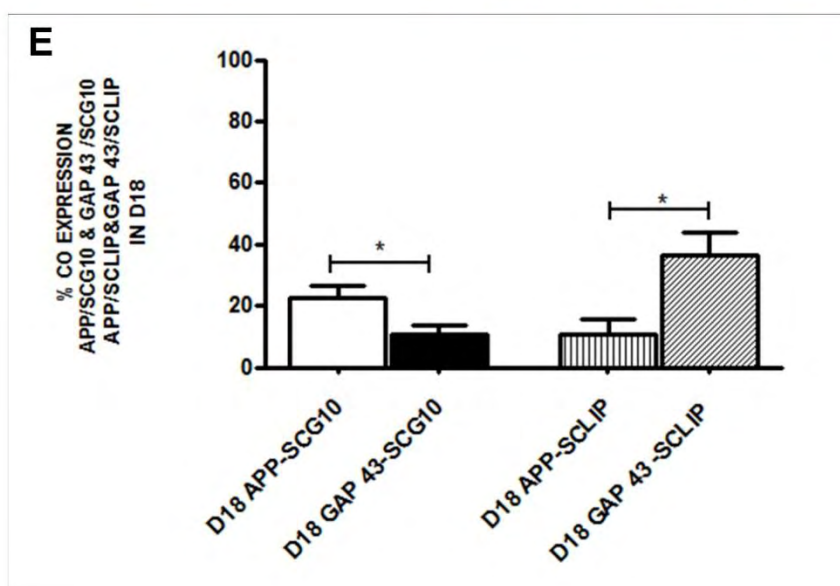
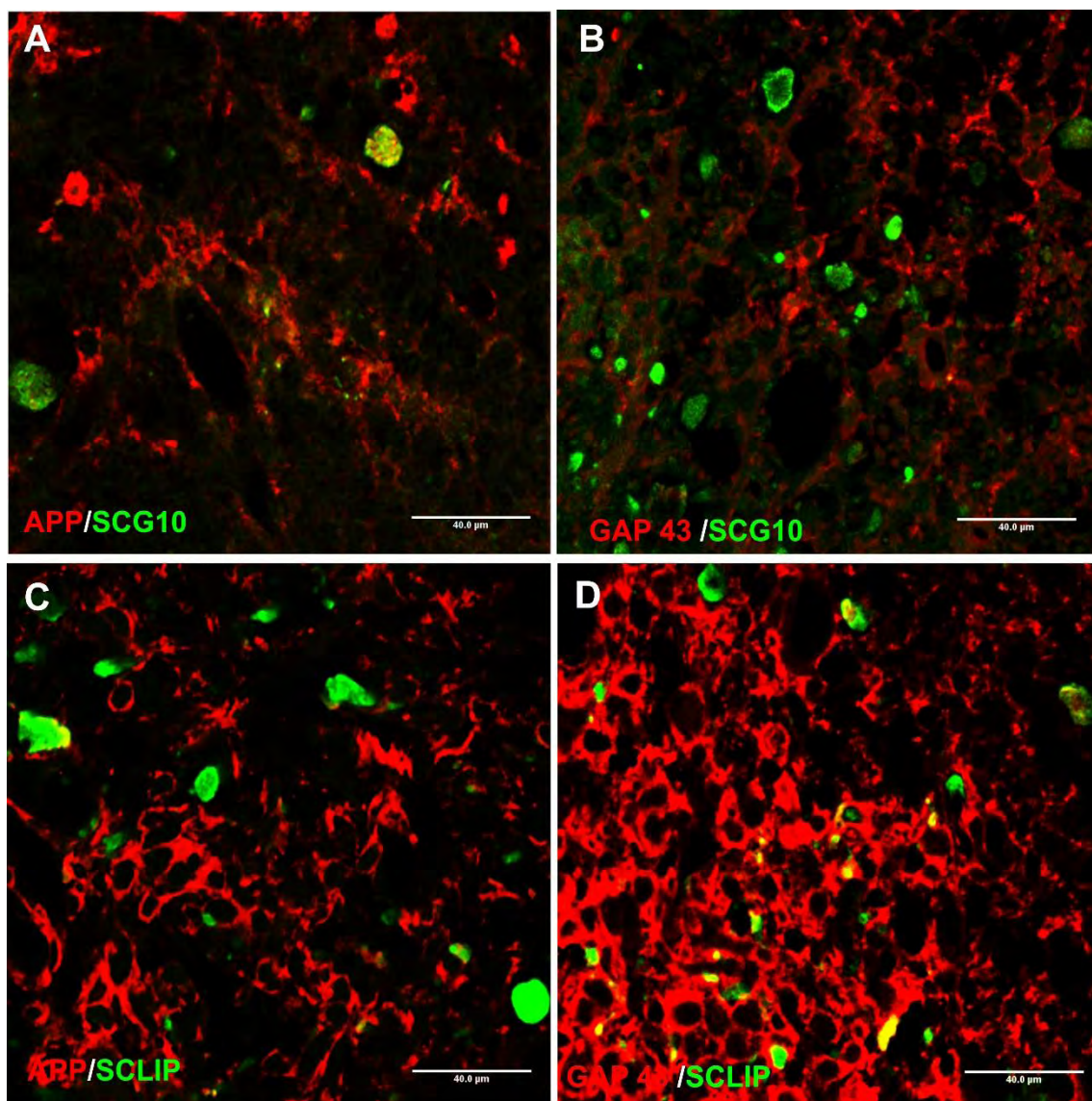
Εικόνα 9a: Γραφήματα από μετρήσεις οι οποίες δείχνουν το μοτίβο έκφρασης της SMI 31 και SMI 32 στους άξονες της λευκής ουσίας σε όλες τις φάσεις της ΠΑΕ (A,D) και η επί τοις εκατό % έκφραση τους σε συσχέτιση με την παρουσία της Σταθμίνης 2 και της Σταθμίνης 3 (B,C,E,F).

ΟΞΕΙΑ ΦΑΣΗ

ΧΡΟΝΙΑ ΦΑΣΗ



Εικόνα 9b: Φωτογραφίες συνεστιακού μικροσκοπίου της SMI32 (κόκκινο) και Σταθμίνη 2 αποδεικνύουν την αυξημένη συνέκφραση στην οξεία φάση (A) και μείωση της συνέκφρασης στη χρόνια φάση (B).



Εικόνα 10: Φωτογραφίες συνεστιακού μικροσκοπίου δείχνουν συνέκφραση της APP (κόκκινο) και Σταθμίνης 2 (SCG10, πράσινο) στους άξονες της οξείας φάσης και ασήμαντη παρουσία

συνέκφρασης της GAP 43 (κόκκινο) με την Σταθμίνη 2 (SCG10,πράσινο) (A,B).Το αντιθετο φαινόμενο παρουσιάζεται σε ότι αφορά τη συνέκφραση της APP(κόκκινο) και Σταθμίνης 3 (SCLIP,πράσινο) και τη συνέκφραση της GAP 43(κόκκινο) με την Σταθμίνη 3 (SCLIP,πράσινο)(C,D).Κλίμακα 40μm.Στο (E) παρουσιάζονται τα γραφήματα των μετρήσεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα μελέτη είχε ως σκοπό τη μελέτη της παρουσίας της Σταθμίνης 1, Σταθμίνης 2, και την Σταθμίνη 3, την κατανομή τους και τις μεταβολές που συντελούνται στο νωτιαίο μυελό κατά τη διάρκεια της ΠΑΕ.

Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν πειραματόζωα C57Bl/6 σε καθεμιά από τις ακόλουθες χρονικές στιγμές της ΠΑΕ: α) αμέσως πριν από την επαγωγή της νόσου (ημέρα 0 - D0), β) την προκλινική φάση (ημέρα 10 -D10) δηλαδή τη χρονική εκείνη στιγμή όπου τα λεμφοκύτταρα είναι ακόμα σε λεμφοειδή όργανα, γ) την οξεία φάση όπου υπάρχουν σημαντικές φλεγμονώδεις εστίες και δ) τη χρόνια φάση, όπου η φλεγμονή στο ΚΝΣ έχει υποχωρήσει και η υποκείμενη παθολογία χαρακτηρίζεται από απομυελίνωση και αξονοπάθεια [50,51,53].

Μελετήθηκε η πρωτεϊνική έκφραση των Σταθμινών στο σύνολο του νωτιαίου μυελού. Διαπιστώθηκε ότι σε σύγκριση με την D0 η Σταθμίνη 1 μειώθηκε κατά την οξεία φάση ενώ στη χρόνια φάση ήταν λίγο αυξημένη. Η Σταθμίνη 2 ήταν μειωμένη στη οξεία φάση σε σύγκριση με την D0 και αυξημένη στη χρόνια συγκρινόμενη με την οξεία φάση. Η μελέτη της Σταθμίνης 3 δεν αποκάλυψε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά. Παρόμοια αποτελέσματα περιγράφηκαν και από την ομάδα του Jastorff όπου αναφέρεται η μείωση της Σταθμίνης στο νωτιαίο μυελό των ενεργητικών και παθητικών μοντέλων της ΠΑΕ [54].

Περαιτέρω ελέγχθηκαν και τα επίπεδα έκφρασης του mRNA των Σταθμινών, τα οποία έδειξαν ότι η Σταθμίνη 1 είχε μειωμένα επίπεδα στην οξεία φάση σε σύγκριση με τα D0. γεγονός που συνάδει με τις αντίστοιχες μεταβολές σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Όσον αφορά τις Σταθμίνες 2 και 3, παρατηρήθηκε χαμηλότερη έκφραση στην οξεία και χρόνια φάση για την Σταθμίνη 3 συγκρινόμενη με την D0, ενώ η έκφραση της Σταθμίνης 2 δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στις συγκρινόμενες ομάδες. Οι αναντιστοιχία μεταξύ μεταβολών στην πρωτεϊνική έκφραση και των επιπέδων mRNA ενδεχομένως να οφείλονται σε μεταφραστικές τροποποιήσεις.

Μελέτες σε ιστούς εγκεφάλου και σε κυτταρικές καλλιέργειες έδειξε ότι η Σταθμίνη 2 σχετίζεται με τη λειτουργία των δενδριτών των νευρώνων και έτσι τη μετάφρασή της σε πρωτεΐνη μπορεί να λάβει χώρα στα σώματα των νευρώνων και να μεταφέρεται κατά μήκος των δενδριτών [55]. Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι η Σταθμίνες 2 και 3 εκφράζονται μόνο στους νευρώνες. Έχει αποδειχθεί ότι η έκφραση της Σταθμίνης 2 ελέγχεται από έναν «σιωπηρό» παράγοντα μη

νευρωνικών κυττάρων τα οποία δεσμεύονται σε ένα νευρωνικό «σιωπηρό» περιοριστικό στοιχείο (Neuronal Restrictive Silencer Element -NRSE). Το γεγονός ότι η Σταθμίνες 2 και 3 έχουν μια συντηρημένη έκφραση mRNA μόνο σε νευρώνες υποδηλώνουν ότι ένα παρόμοιο NRSE εμπλέκεται επίσης και στην έκφραση της Σταθμίνης 3 [56,57].

Η Σταθμίνη 2 ταυτοποιήθηκε ως δείκτης πρώιμης νευρωνικής διαφοροποίησης που απαντάται κυρίως κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του Νευρικού Συστήματος με προοδευτική μείωση προϊούσης της ωρίμανσης, ενώ η Σταθμίνη 3, αν και έχει παρουσία κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης όπως και η Σταθμίνη 2, η έκφρασή της παραμένει και στα πλήρως διαφοροποιημένα ώριμα κύτταρα [56,57,58]

Με δεδομένη την επίδραση της φλεγμονής στην έκφραση των σταθμινών στο ΚΝΣ [59] από τη μία και τη διαφορετική κατανομή των φλεγμονωδών στοιχείων στη λευκή και φαιά ουσία, κατά την εξέλιξη της ΠΑΕ, έγινε υποανάλυση της περιοχικής κατανομής των σταθμινών. Στη φαιά ουσία η έκφραση της Σταθμίνης 1 ήταν αυξημένη στη ομάδα της χρόνιας φάσης. Από την άλλη πλευρά, η έκφραση της Σταθμίνης 2 μειώθηκε από την ημέρα 10 και συνεχίστηκε μέχρι την χρόνια φάση ενώ η Σταθμίνη 3 σημείωσε μείωση από την οξεία φάση. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η έκφραση της Σταθμίνης 2 επηρεάζεται νωρίς στην πορεία της ΠΑΕ, ενώ της Σταθμίνης 3 επηρεάζεται μόνο στην οξεία φάση. Αυτό μπορεί να αποδοθεί στο ενδεχόμενο οι ανώριμοι τύποι νευρώνων που εκφράζουν Σταθμίνη 2 να επηρεάζονται νωρίτερα κατά τη διάρκεια της νόσου, ενώ οι ώριμες μορφές που εκφράζουν Σταθμίνης 3 να επηρεάζονται ως επί το πλείστον κατά τη διάρκεια της οξείας φάσης.

Στη λευκή ουσία προσδιορίστηκε ότι η Σταθμίνη 1 αυξάνεται κατά την οξεία φάση σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών. Η Σταθμίνη 2 και 3 απουσιάζουν από την ομάδα των φυσιολογικών και από την φάση ημέρα 10, ενώ εμφανίζεται στην οξεία και χρόνια φάση της νόσου. Πρέπει να αναφερθεί ότι οι περιοχές της λευκής ουσίας στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις είναι περιοχές με παρουσία φλεγμονής κατά την οξεία φάση. Προηγούμενες μελέτες στον εγκέφαλο του αρουραίου αποκάλυψε ότι υπήρχε έλλειψη της Σταθμίνης 2 και 3 στη λευκή ουσία στο στάδιο των φυσιολογικών ενώ αντίθετα υπάρχει παρουσία της Σταθμίνης 1 [60]. Στη βάση των δεδομένων μας από την κατανομή των σταθμινών σε φαιά και λευκή ουσία, συμπεραίνεται ότι επέρχονται μεταβολές στην έκφρασή τους ανεξάρτητα από την παρουσία φλεγμονωδών διηθήσεων, καθώς οι τελευταίες περιορίζονται στη λευκή ουσία.

Συνεχίσαμε τη μελέτη με τη διερεύνηση της έκφρασης των σταθμινών σε επιμέρους κυτταρικούς πληθυσμούς. Για το σκοπό αυτό, εκτιμήθηκε καταρχήν η παρουσία των ολιγοδενδροκυττάρων μέσα στην περιοχή της φλεγμονής (λευκή ουσία), χρησιμοποιώντας δείκτες

NG2, δείκτη προγονικών ολιγοδενδροκυττάρων [61,62], δείκτη ανάπτυξης ολιγοδενδροκυττάρου O4 [63,64] και την ώριμων ολιγοδενδροκυττάρων και μυελίνης CNPase [53].

Παρατηρήθηκε μικρός αριθμός NG2 θετικών κυττάρων στην ομάδα των φυσιολογικών και την ημέρα 10 ενώ εμφανίστηκε αύξηση στην οξεία φάση συγκρινόμενα πάλι με τις ίδιες ομάδες και αντίστοιχα περιορίζεται ξανά στη χρόνια φάση. Η έκφραση NG2 συχνά αυξάνεται σε περιοχές με περιβάλλον φλεγμονής και ιστούς που έχουν υποστεί βλάβη και παραμένουν ακόμη και στο σχηματισμό ουλής. [65] Ωστόσο, μέχρι τώρα δεν είχαν περιγραφεί με σαφήνεια οι μεταβολές στα επίπεδα NG2 στην ΠΑΕ. [66] Παρόμοιο μοτίβο έκφρασης ανιχνεύθηκε στα O4 θετικά αναπτυσσόμενα ολιγοδενδροκύτταρα. Αντίθετα τα CNPase θετικά κύτταρα ακολουθούν ένα διαφορετικό πρότυπο έκφρασης όπου τα υψηλότερα επίπεδα συναντήθηκαν στην ομάδα των φυσιολογικών ενώ σταδιακά μειώνεται μέχρι την χρόνια φάση. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι υπάρχει αύξηση στους ανώριμους τύπους των ολιγοδενδροκυττάρων κατά την διάρκεια της πορείας της νόσου ενώ παρατηρείται μείωση των ώριμων μορφών των ολιγοδενδροκυττάρων.

Συνεχίστηκε περαιτέρω ανάλυση της συνέκφρασης των ανωτέρω δεικτών με τη Σταθμίνη 1, όπου δεν εντοπίστηκε καμία συν-έκφραση των NG2 (+) κυττάρων και της Σταθμίνης 1 στη ομάδα των φυσιολογικών. Η συνέκφραση εμφανίστηκε σε χαμηλά επίπεδα στην ημέρα 10 και συνεχίστηκε η αύξηση κατά την οξεία φάση ενώ αποκόπτεται τη χρόνια φάση. Επίσης όσο αφορά τα επίπεδα συνέκφρασης της O4 με την Σταθμίνη 1 ήταν σε χαμηλά επίπεδα στην ομάδα των φυσιολογικών και στην ομάδα της ημέρας 10 ενώ αυξήθηκε κατά την οξεία φάση. Η ερευνητική ομάδα του Liu και συνεργατών έχει αποδείξει ότι η αύξηση έκφρασης της Σταθμίνης αποτρέπει την ανάπτυξη και ωρίμανση των ολιγοδενδροκυττάρων και διατηρεί τα κύτταρα σε ανώριμα μορφές ενώ τα μειωμένα επίπεδα αυτής της πρωτεΐνης ευνοούν την ανάπτυξη τους μέσω επιγενετικής ρύθμισης διάμεσό της απακετυλίωσης της ιστόνης στη γονιδιακή έκφραση. [67] Αυτό υποστηρίζεται περαιτέρω από τη μελέτη της Mastronardi και συνεργατών στην οποία αναφέρεται ότι Σταθμίνη 1 είναι μία πρωτεΐνη αποσταθεροποίησης των μικροσωληνίσκων που εμποδίζει την επούλωση στον εγκέφαλο που έχει υποστεί κάποιου βαθμού απομυελίνωσης [68].

Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι η συνέκφραση CNPase θετικών κυττάρων και Σταθμίνης 1 αποτελούσαν το 100% του πληθυσμού των κυττάρων την ομάδα των φυσιολογικών και της ομάδας ημέρας 10 ενώ η συνέκφραση μειώθηκε στη οξεία φάση. Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε αντίθεση με τη μελέτη του Liu και συνεργατών ο οποίος δηλώνει ότι συνέκφραση CNPase θετικών κυττάρων και Σταθμίνης 1 είναι αυξημένη στο εσωτερικό των αλλοιώσεων-φλεγμονών του εγκεφάλου των ασθενών με MS [59].

Δεδομένου ότι δεν υπήρχε πλήρης συνέκφραση της Σταθμίνης 1 με τα NG2 (+) κύτταρα στην οξεία φάση, αναλύθηκε περαιτέρω η φύση του πληθυσμού των NG2 (+) κυττάρων και αποκαλύφθηκε ότι ο δείκτης μακροφάγων Mac 3 εκφράζεται στον υπόλοιπο NG2 θετικό πληθυσμό, κάτι που κοινοποιείται και από άλλες μελέτες και χαρακτηρίζει τον υπο-πληθυσμό των μακροφάγων που προέρχονται από το αίμα. Ωστόσο αυτοί οι μακροφαγικοί πληθυσμοί δε συμβάλλουν στη συγκέντρωση του NG2 θετικών κυττάρων στην περιοχή της φλεγμονής [65].

Συνεχίσαμε με τη διερεύνηση της παρουσίας των αστροκυττάρων μέσα στην περιοχή της φλεγμονής (λευκή ουσία). Χαμηλά επίπεδα έκφρασης βρέθηκαν στην ομάδα των φυσιολογικών και της ομάδας της ημέρας 10. Η έκφραση αυξήθηκε κατά την οξεία φάση και επέστρεψαν στα επίπεδα της φυσιολογικής ομάδας χρόνιας φάσης [69]. Στη συνέχεια αναλύθηκε η συνέκφραση των GFAP θετικών κυττάρων με την Σταθμίνη 1 η οποία έδειξε και πάλι αυξημένη συν-έκφραση στην οξεία φάση σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών, γεγονός που μειώνεται στη χρόνια φάση. Στην ομάδα των φυσιολογικών η μορφολογία των GFAP κυττάρων χαρακτηρίζεται από λεπτές ακτινικές προεκβολές (radial glia) ενώ στην οξεία φάση αυτή μεταβάλλεται προς αντιδραστική αστρογλοία (reactive glia). Προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει ότι στην ΠΑΕ ο μετασχηματισμός της ακτινικής προς αντιδραστική μικρογλοία στη λευκή ουσία του νωτιαίου μυελού οφείλεται στη μίτωση και στον φαινοτυπικό μετασχηματισμό, προκειμένου να συνθέσουν προφλεγμονώδη μόρια και να παρουσιάσουν τα αντιγόνα στα T λεμφοκύτταρα [70]. Η αντιδραστική αστρογλοία συνθέτει αυξημένες ποσότητες υαλουρονικού το οποίο συσσωρεύεται στο σημείο της φλεγμονής στο μοντέλο της ΠΑΕ και αναστέλλει την ωρίμανση των προγονικών ολιγοδενδροκυττάρων [70,71].

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση των σταθμινών στους δενδρίτες των νευρώνων, ως δείκτης χρησιμοποιήθηκε η MAP 2 πρωτεΐνη, η οποία εκφράζεται στους μικροσωληνίσκους των κινητικών νευρώνων της φαιάς ουσίας του νωτιαίου μυελού στο σώμα και τους δενδρίτες [72,73]. Η MAP 2 αποτελεί ένα πολύ σημαντικό μόριο αφού προστατεύει τους μικροσωληνίσκους από το αποπολυμερισμό και είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη και τη συντήρηση των μικροσωληνίσκων του κυτταροσκελετού [74]. Για τον προσδιορισμό της χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές μέθοδοι αξιολόγησης, στην πρώτη μετρήθηκε το μέγεθος του περικάρυου (μm^2), η οποία προσδιορίζει την ακεραιότητα των νευρώνων και στη δεύτερη μέθοδο, χρησιμοποιήθηκε η ολοκληρωμένη πυκνότητα ως εργαλείο για να καταδειχθούν οι αλλαγές που συντελούνται στην κυτταροπλασματική πυκνότητα των μικροσωληνίσκων του σώματος των νευρώνων. Τα αποτελέσματα έδειξαν μειωμένη έκφραση της MAP 2 στην οξεία και χρόνια φάση σε σύγκριση με την ομάδα των φυσιολογικών και την ομάδα της ημέρας 10. Η μείωση της έκφρασης της δεδομένου ότι παραμένει και στη χρόνια φάση μπορεί να συγκλίνει στο γεγονός ώστε αυτή να

αποτελεί έναν λόγο για τη μόνιμη παράλυση στο μοντέλο της ΠΑΕ. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζονται και από άλλες μελέτες οι οποίες έδειξαν διαφορές στο μέγεθος του περικάρυου στην οξεία φάση ενώ παράλληλα παρατηρήθηκε ότι οι δενδρίτες των κινητικών νευρώνων τους ήταν πιο λεπτοί, μικρότεροι και δυστροφικοί κάτι που συντελεί στην ατροφία του περικάρυου [75,76]. Φαίνεται ότι η αυτοάνοση απομυελίνωση έχει επίπτωση στον κυτταροσκελετό των κινητικών νευρώνων και ως εκ τούτου ενδεχόμενες μεταβολές στην έκφραση των σταθμινών, δεν μπορεί να αποκλειστεί. Εξετάστηκε στη συνέχεια και η συνέκφραση της MAP 2 με τις Σταθμίνες, οπότε και φάνηκε ότι υπάρχει συνέκφραση μόνο με την Σταθμίνη 2 και 3, ενώ δεν παρουσιάζεται συνέκφραση με τη Σταθμίνη 1. Η συνέκφραση παραμένει σε όλες τις φάσεις της ΠΑΕ και οι μεταβολές τους βαίνουν παράλληλα.

Προκειμένου να μελετηθεί η έκφραση των σταθμινών στους άξονες, αναλύσαμε περαιτέρω την παρουσία των νευρονηματιών της φωσφορυλιωμένης μορφής SMI 31 και μη-φωσφορυλιωμένο SMI 32, τα οποία προσδιορίζουν τη παρουσία κανονικών και εκφυλισμένων νευραξόνων. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υπήρχε αυξημένη παρουσία της SMI 31 στην ομάδα των φυσιολογικών και στη φάση της ημέρας 10, κάτι που αποδεικνύει ότι οι αξονες παραμένουν αναλλοίωτοι ενώ παρατηρείται μείωση στην οξεία και χρόνια ομάδα. Αντίθετα ο αριθμός των εκφυλισμένων νευραξόνων που εκφράζουν SMI32 αυξάνεται στην οξεία φάση. Η απώλεια των φωσφορυλιωμένων νευραξόνων έχει παρουσιαστεί σε προηγούμενες μελέτες χρησιμοποιώντας ορό φωσφορυλιωμένων νευροϊνιδίων H, ως δείκτης της βλάβης της ΠΑΕ. Στην μελέτη της Budde και συνεργατών παρατηρήθηκε απώλεια η οποία φθάνει μέχρι 40% του νωτιαίου μυελού ενώ αντίστοιχα υπήρχε παράλληλη αύξηση του αριθμού των μη-φωσφορυλιωμένων νευραξόνων SMI 32 [77,78].

Στη συνέχεια μελετήθηκε η συν-έκφραση της SMI 31 και SMI 32 με την Σταθμίνη 2 και 3. Αυτή η ανάλυση διεξήχθη επειδή οι δυο αυτές Σταθμίνες εκφράζονται μόνο στους νευρώνες και προκειμένου να γίνει συσχετισμός της παρουσίας τους με τους φυσιολογικούς ή παθολογικούς νευράξονες. Η παρουσία της SMI 31 με την Σταθμίνη 2 και 3 στους άξονες ακολουθούν το ίδιο μοτίβο της συν-έκφρασης, δηλαδή αυξημένη συνέκφραση στη οξεία φάση σε σύγκριση με την φυσιολογική ομάδα και τη φάση της ημέρας 10 και πτώση στη χρόνια φάση. Η παρουσία της SMI 32 με την Σταθμίνη 2 και 3 επίσης ήταν αυξημένη στη οξεία φάση αλλά παρουσίασε πτώση στη χρόνια φάση. Η μείωση της συνέκφρασης στη χρόνια φάση ωστόσο είχε στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο σε ότι αφορά την SMI 32 με την Σταθμίνη 2. Ένα σημαντικό θέμα στο οποίο πρέπει κανείς να αναφερθεί είναι ότι δεν υπάρχει συνέκφραση στην ομάδα των φυσιολογικών και στη ομάδα της ημέρας 10, δεδομένου ότι η Σταθμίνη 2 και 3 δεν είναι παρούσες στη λευκή ουσία του νωτιαίου μυελού σε αυτές τις συνθήκες.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι η συνέκφραση των Σταθμινών 2 και 3 στους άξονες στην οξεία φάση απαντάται σε μεγαλύτερο ποσοστό με τη μη-φωσφορυλιωμένη μορφή -SMI 32 απ' ό,τι με την φωσφορυλιωμένη μορφή -SMI 31. Μια υπόθεση που μπορεί να βασιστεί στα παραπάνω αποτελέσματα είναι ότι όταν υπάρχει μείωση της έκφρασης της Σταθμίνης 2 και 3 στη φαιά ουσία υπάρχει αύξηση τους στους άξονες της λευκής ουσίας, γεγονός που μπορεί να συσχετιστεί με την παρουσία φλεγμονωδών διεργασιών. Αυτή η αύξηση της έκφρασης στους άξονες μπορεί να υποδεικνύει παθογενετικό μηχανισμό, δεδομένου ότι εκφράζεται κυρίως στους μη-φωσφορυλιωμένους νευράξονες.

Διερευνήθηκε επίσης και η συσχέτιση της APP και GAP 43 με την Σταθμίνη 2 και 3 προκειμένου να προσδιοριστεί αν αυτές εκφράζονται σε νευράξονες οι οποίοι είναι οξέως τραυματισμένοι (APP θετικοί) [79] ή σε αναγεννημένους άξονες και στους αυξητικούς κώνους (GAP 43 θετικοί) [53,80] στην οξεία φάση. Φάνηκε ότι η συνέκφραση της Σταθμίνης 2 και της APP στους άξονες ήταν αυξημένη σε σχέση με την συνέκφραση με την GAP 43. Αντίθετα, η συνέκφραση της Σταθμίνης 3 με την APP μειώθηκε στην οξεία φάση σε σύγκριση με την συνεκφραση της Σταθμίνης 3 και της GAP 43 [55]. Συμπερασματικά, η σταθμίνη 2 φαίνεται να σχετίζεται με τον οξύ τραυματισμό των αξόνων ενώ η 3 με τους αναγεννημένους νευράξονες. Το αν αποτελεί αιτία η αποτέλεσμα της εκφυλιστικής και/ή αναγεννητικής δραστηριότητας των αξόνων, μένει να διερευνηθεί. Από τα δεδομένα μας ωστόσο, προκύπτει ότι η μεταβολή των επιπέδων της σταθμίνης 2 αρχίζει ήδη από την προκλινική φάση της νόσου και στη συνέχεια η έκφραση της ίδιας σταθμίνης προεξάρχει στους τραυματισμένους νευράξονες. Το αν η κινητική αυτή σηματοδοτεί προσπάθεια διατήρησης του κυτταροσκελετού των αξόνων που πρόκειται να εκφυλιστούν ή συμμετοχή στην επερχόμενη εκφυλιστική διαδικασία δεν μπορεί να ξεκαθαριστεί από τα δεδομένα μας. Η συνέκφραση ωστόσο της σταθμίνης 3 με τους αναγεννημένους νευράξονες ενδεχομένως να σημαίνει ότι η σταθμίνη-2 τελικά σχετίζεται με την εκφύλιση ενώ η - 3 με την αναγέννηση.

Στη μελέτη αυτή αναλύθηκε το πρότυπο έκφρασης των Σταθμινών και η συσχέτιση τους σε διαφορετικά χρονικά σημεία στο μοντέλο της ΠΑΕ. Ταυτοποιήσαμε την έκφραση τους σε ολόκληρο το νωτιαίο μυελό και έγινε υπο-ανάλυση τους στη φαιά και λευκή ουσία. Διερευνήσαμε επίσης την συσχέτιση τους με τους διαφορετικούς κυτταρικούς τύπους του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος καθώς και με πρωτεΐνες που εκφράζονται σε τραυματισμένους άξονες ή σε άξονες που βρίσκονται σε κατάσταση αναγέννησης. Οι μεταβολές της έκφρασης των σταθμινών κατά τη διάρκεια της ΠΑΕ σηματοδοτούν το ρόλο τους για τις μεταβολές του κυτταροσκελετού κατά την αυτοάνοση απομυελίνωση του ΚΝΣ, ενώ ο διακριτός ρόλος καθεμιάς από τις σταθμίνες χρήζει περεταίρω διερεύνησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Cooper GM ,The Cell: A Molecular Approach. Sunderland (MA): Sinauer Associates; Chapter 11 ,The Cytoskeleton and Cell Movement, 2nd edition 2000
2. Daniel A. Fletcher and R. Dyche Mullins. Cell mechanics and the cytoskeleton,Nature. Jan 28; 463(7280): 485–492.) 2010
3. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter Molecular Biology of the Cell (5th ed.). New York: Garland Science. ISBN 978-0-8153-4105-5.4.(2007)
4. Roberto Dominguez and Kenneth C. Holmes. Actin Structure and Function .Annu Rev Biophys. 9; 40: 169–186.(2011)
- 5.Desai A.; and Mitchison TJ; (1997). "Microtubule polymerization dynamics." Annu Rev Cell Dev Biol 13: 83–117. doi:10.1146/annurev.cellbio.13.1.83. PMID 9442869.
6. Sandrine Etienne-Manneville. From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players, Current Opinion in Cell Biology,Volume 22, Issue 1, , Pages 104–111 (February 2010)
7. Maccioni RB, Cambiazo V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. Physiol Rev. 75(4):835-64. (1995, Oct)
8. Anna Akhmanova,Casper C Hoogenraad. Microtubule plus-end-tracking proteins: mechanisms and functions, , Current Opinion in Cell Biology,Vol. 17, Issue 1, Pages 47–54.(February 2005)
9. Claire E Walczak .Microtubule dynamics and tubulin interacting proteins, Current Opinion in Cell Biology,Volume 12, Issue 1, Pages 52–56. (February 2000)
10. Francis J. McNally. Microtubule dynamics: Controlling split ends, Current Biology 9:R274–R276,(1999).
11. AT Fojo .The role of microtubules in cell biology, neurobiology, and oncology Humana Press,ISBN:978-1-58829-294-0,2008.
12. Sylvie Ozon, Salah El Mestikawy, and André´ Sobel. Differential, Regional, and Cellular Expression of the Stathmin Family Transcripts in the Adult Rat Brain, Journal of Neuroscience Research 56:553–564 (1999).
13. Olivier Gavet, Sylvie Ozon, Valérie Manceau, Sean Lawler*, Patrick Curmi and André Sobel. The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network, Journal of Cell Science 111, 3333-3346 (1998)
14. Niklas Larsson,Ulrica Marklund, Helena Melander, Gradin Go,Ran Brattsand, Martin Gullberg *Molecular and Cellular Biology, p. 5530–5539, Sept. 1997

15. Lynne Cassimeris, The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers, *Current Opinion in Cell Biology*, Volume 14, Issue 1, ,Pages 18–241, February 2002
17. Gilbert Di Paolaa, Bruno Antonssonb, Daniel Kasselc, Beat M Riederera, Gabriele Grenningloha, Phosphorylation regulates the microtubule-destabilizing activity of stathmin and its interaction with tubulin *FEBS Letters* Volume 416, Issue 2, 20, Pages 149–152 (October 1997)
16. Camelia Iancu Rubin and George F. Atweh. The Role of Stathmin in the Regulation of the Cell Cycle, *Journal of Cellular Biochemistry* 93:242–250 (2004)
18. Lisa D. Belmont and Timothy J. Mitchison, Identification of a Protein That Interacts with Tubulin Dimers and Increases the Catastrophe Rate of Microtubules. *Cell*, Vol. 84, 623–631, February 23, 1996.
19. Line Jourdain , Patrick Curmi , André Sobel , Dominique Pantaloni , and Marie-France Carlier, Stathmin: A Tubulin-Sequestering Protein Which Forms a Ternary T2S Complex with Two Tubulin Molecules, *Biochemistry* , 36 (36), pp 10817–10821, Sept. 9/1997.
20. Olivier Gavet, Sylvie Ozon, Valérie Manceau, Sean Lawler*, Patrick Curmi and André Sobel. The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network ,*Journal of Cell Science* 111, 3333-3346 (1998)
21. Anderson, D. J. and Axel, R. Molecular probes for the development and plasticity of neural crest derivatives. *Cell* 42, 649-662. (1985).
22. T. Okazaki, H. Wang, E. Masliah, M. Cao, S. A. Johnson, M. Sundsmo, T. Saitoh and N. Mori. SCG10, A Neuron-Specific Growth-Associated Protein in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging*, Vol. 16, No. 6, pp. 883-894, (1995).
23. Gabriele Grenningloh, Sophia Soehrman, Percy Bondallaz, Evelyne Ruchti, Hugues Cadas Role of the Microtubule Destabilizing Proteins SCG10 and Stathmin in Neuronal Growth *J Neurobiol* 58: 60-69, (2004)
24. Ozon, S., Byk, T., Sobel, A., SCLIP: a novel SCG10-like protein of the stathmin family expressed in the nervous system. *J. Neurochem.* 70, 2386–2396.(1998).
25. Poulain, F.E., Sobel, A. The "SCG10-Like Protein" SCLIP is a novel regulator of axonal branching in hippocampal neurons, unlike SCG10.. *Mol. Cell. Neurosci.* (2007)
26. Ozon S, El Mestikawy S, Sobel A. Differential, regional, and cellular expression of the stathmin family transcripts in the adult rat brain. *J Neurosci Res.* Jun 1;56(5):553-64. (1999)
27. Sylvie Ozon, Alexandre Maucuer and André Sobel. Molecular and Biological Characterization of Novel Mammalian Proteins Expressed in the Nervous System. *European Journal of Biochemistry* Volume 248, Issue 3, pages 794–806, (September 1997)

28. Erica J. Beilharz,¹ Eugene Zhukovsky,¹ Anthony A. Lanahan,² Paul F. Worley,^{2,3} Karoly Nikolich,¹ and Laurie J. Goodman¹. Neuronal Activity Induction of the Stathmin-Like Gene RB3 in the Rat Hippocampus: Possible Role in Neuronal Plasticity. *The Journal of Neuroscience*, , 18(23):9780–9789. December 1, 1998
29. Milo, R., & Kahana, E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev*, 9(5), A387-394. (2010).
30. J.F. Kurtzke. Epidemiology and etiology of multiple sclerosis. *Phys Med Rehabil Clin North Am*, 16 pp. 327–349. (2005)
31. C.R. Gale, C.N. Martyn Migrant studies in multiple sclerosis *Prog Neurobiol*, 47, pp. 425–448, (1995).
32. Antel JP, Arnason BGW. Demyelinating diseases. In: Wilson JD, Braunwald E (eds) *Harrisons Principles of Internal Medicine*. 12th ed, McGraw-Hill, New York, :356 (1991)
33. Compston A, Coles A «Multiple sclerosis». *Lancet* 372(9648): 1502–17. (October 2008).
34. Jagannath, VA; Fedorowicz, Z; Asokan, GV; Robak, EW; Whamond, L «Vitamin D for the management of multiple sclerosis.» (2010 Dec 8).
35. Gregory F. Wu and Enrique Alvarez, The immuno-pathophysiology of multiple sclerosis, *Neurol Clin.*; 29(2): 257–278. (2011 May)
36. Frohman EM, Racke MK, Raine CS, Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*. 354(9):942-55. (Mar.2006)
37. Amedeo Amedei, Domenico Prisco, and Mario Milco D'Elios .Multiple Sclerosis: The Role of Cytokines in Pathogenesis and in Therapies, *Int J Mol Sci*. 2012; 13(10): 13438–13460.
38. José Francisco Zambrano-Zaragoza, Enrique Jhonatan Romo-Martínez, Ma. de Jesús Durán-Avelar, Noemí García-Magallanes, and Norberto Vibanco-Pérez .Th17 Cells in Autoimmune and Infectious Diseases. *Int J Inflam.*; 2014: 651503. (2014)
39. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, et al. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med*. ;338:278. (1998)
40. Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H .Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci*. Jun; 25(6):313-9. (2002)
41. K.Gijbels¹, S. Engelborghs² and P.P. De Deyn² Experimental autoimmune encephalomyelitis: An animal model for multiple sclerosis *Neuroscience Research Communication*. Volume 26, Issue 3, pages 193–206, (May/June 2000)
42. Cris S Constantinescu, Nasr Farooqi, Kate O'Brien, and Bruno Gran Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol.*; 164(4): 1079–1106 (2011 Oct)

43. Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc.* ;1(4):1810-9. (2006)
44. Torkildsen OI, Brunborg LA, Myhr KM, Bø L The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl.* ;188:72-6 (2008).
45. Derrick P, McCarthy, Maureen H. Richards, and Stephen D. Miller Mouse Models of Multiple Sclerosis: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Theiler's Virus-Induced Demyelinating Disease. *Methods Mol Biol.* Author manuscript; available in PMC (2013).
46. Christine Beeton, Adriana Garcia, and K. George Chandy Induction and Clinical Scoring of Chronic-Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Vis Exp.*; (5): 224. (2007)
47. Mitchell R Emerson,¹ Ryan J Gallagher,^{2,†} Janet G Marquis,³ Steven M LeVine Enhancing the Ability of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to Serve as a More Rigorous Model of Multiple Sclerosis through Refinement of the Experimental Design *Comp Med.*; 59(2): 112–128(2009 Apr).
48. Alla Katsnelson. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, Multiple Sclerosis Discovery Forum <http://www.msdiscovery.org/research-resources/animal-models/3674-experimental-autoimmune-encephalomyelitis>(23OCT2012)
49. Hooke Laboratories: <http://hookelabs.com>
50. Grigoriadis N, Loubopoulos A, Lagoudaki R, Frischer JM, Polyzoidou E, et al. Variable behavior and complications of autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplanted in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol* 230: 78-89. (2011)
51. Loubopoulos A, Grigoriadis N, Lagoudaki R, Touloumi O, Polyzoidou E, et al. Administration of 2-arachidonoylglycerol ameliorates both acute and chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 1390: 126-141. (2011)
52. Kandace K. Fleming^a, James A. Bovaird^a, Michael C. Mosier^b, Mitchell R. Emerson^b, Steven M. LeVine^b, Janet G. Marquis. Statistical analysis of data from studies on experimental autoimmune encephalomyelitis, *Journal of Neuroimmunology*, Pages 71–84(December 2005)
53. Theotokis P, Loubopoulos A, Touloumi O, Lagoudaki R, Kofidou E, et al. Time course and spatial profile of Nogo-A expression in experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *J Neuropathol Exp Neurol* 71: 907-920. (2012)
54. Jastorff AM, Haegler K, Maccarrone G, Holsboer F, Weber F, et al. Regulation of proteins mediating neurodegeneration in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proteomics Clin Appl* 3: 1273-1287. (2009)

55. Himi T, Okazaki T, Wang H, McNeill TH, Mori N (1994) Differential localization of SCG10 and p19/stathmin messenger RNAs in adult rat brain indicates distinct roles for these growth-associated proteins. *Neuroscience* 60: 907-926.
56. Ozon S, Byk T, Sobel A SCLIP: a novel SCG10-like protein of the stathmin family expressed in the nervous system. *J Neurochem* 70: 2386-2396. (1998)
57. Ozon S, El Mestikawy S, Sobel A Differential, regional, and cellular expression of the stathmin family transcripts in the adult rat brain. *J Neurosci Res* 56: 553-564(1999).
58. Anderson DJ, Axel R Molecular probes for the development and plasticity of neural crest derivatives. *Cell* 42: 649-662(1985).
59. Liu A, Stadelmann C, Moscarello M, Bruck W, Sobel A, et al. Expression of stathmin, a developmentally controlled cytoskeleton-regulating molecule, in demyelinating disorders. *J Neurosci* 25: 737-747(2005).
60. Ozon S, El Mestikawy S, Sobel A Differential, regional, and cellular expression of the stathmin family transcripts in the adult rat brain. *J Neurosci Res* 56: 553-564. (1999)
61. Liu A, Stadelmann C, Moscarello M, Bruck W, Sobel A, et al. Expression of stathmin, a developmentally controlled cytoskeleton-regulating molecule, in demyelinating disorders. *J Neurosci* 25: 737-747. (2005)
62. Kucharova K, Chang Y, Boor A, Yong VW, Stallcup WB Reduced inflammation accompanies diminished myelin damage and repair in the NG2 null mouse spinal cord. *J Neuroinflammation* 8: 158. (2011)
63. Dawson MR, Levine JM, Reynolds R NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res* 61: 471-479(2000).
64. Levine JM, Reynolds R, Fawcett JW The oligodendrocyte precursor cell in health and disease. *Trends Neurosci* 24: 39-47(2001).
65. Moransard M, Dann A, Staszewski O, Fontana A, Prinz M, et al. NG2 expressed by macrophages and oligodendrocyte precursor cells is dispensable in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 134: 1315-1330(2011).

66. Reynolds R, Dawson M, Papadopoulos D, Polito A, Di Bello IC, et al. The response of NG2-expressing oligodendrocyte progenitors to demyelination in MOG-EAE and MS. *J Neurocytol* 31: 523-536(2002).
67. Liu A, Muggironi M, Marin-Husstege M, Casaccia-Bonnel P Oligodendrocyte process outgrowth in vitro is modulated by epigenetic regulation of cytoskeletal severing proteins. *Glia* 44: 264-274(2003).
68. Mastronardi FG, Moscarello MA Molecules affecting myelin stability: a novel hypothesis regarding the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 80: 301-308 (2005).
69. Sofroniew MV, Vinters HV Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7-35 (2010)
70. Bannerman P, Hahn A, Soulika A, Gallo V, Pleasure D Astroglisis in EAE spinal cord: derivation from radial glia, and relationships to oligodendroglia. *Glia* 55: 57-64 (2007).
71. Back SA, Tuohy TM, Chen H, Wallingford N, Craig A, et al. Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med* 11: 966-972 (2005).
72. Tucker RP, Binder LI, Viereck C, Hemmings BA, Matus AI The sequential appearance of low- and high-molecular-weight forms of MAP2 in the developing cerebellum. *J Neurosci* 8: 4503-4512. (1988)
73. Tucker RP The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Brain Res Rev* 15: 101-120 (1990).
74. Poulain FE, Sobel A The microtubule network and neuronal morphogenesis: Dynamic and coordinated orchestration through multiple players. *Mol Cell Neurosci* 43: 15-32 (2010).
75. Bannerman PG, Hahn A, Ramirez S, Morley M, Bonnemann C, et al. Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice. *Brain* 128: 1877-1886 (2005).
76. Zhu B, Luo L, Moore GR, Paty DW, Cynader MS Dendritic and synaptic pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol* 162: 1639-1650 (2003).

77. Gresle MM, Shaw G, Jarrott B, Alexandrou EN, Friedhuber A, et al. Validation of a novel biomarker for acute axonal injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res* 86: 3548-3555(2008).
78. Budde MD, Kim JH, Liang HF, Russell JH, Cross AH, et al. Axonal injury detected by in vivo diffusion tensor imaging correlates with neurological disability in a mouse model of multiple sclerosis. *NMR Biomed* 21: 589-597(2008).
79. Herrero-Herranz E, Pardo LA, Gold R, Linker RA Pattern of axonal injury in murine myelin oligodendrocyte glycoprotein induced experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 30: 162-173 (2008).
80. Goslin K, Schreyer DJ, Skene JH, Banker G Development of neuronal polarity: GAP-43 distinguishes axonal from dendritic growth cones. *Nature* 336: 672-674 (1988).